

AUS DEM LEHRSTUHL INNERE MEDIZIN I  
LEITUNG: PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**REGULATION DER BAFF-PRODUKTION IN SYNOVIALEN FIBROBLASTEN  
DURCH ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN UND NEUROENDOKRINE FAKTOREN –  
EINE VERGLEICHENDE STUDIE ZWISCHEN OSTEOARTHROSE UND  
RHEUMATOIDER ARTHRITIS**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Marina Hedwig Bäuml

2017



AUS DEM LEHRSTUHL INNERE MEDIZIN I  
LEITUNG: PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**REGULATION DER BAFF-PRODUKTION IN SYNOVIALEN FIBROBLASTEN  
DURCH ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN UND NEUROENDOKRINE FAKTOREN –  
EINE VERGLEICHENDE STUDIE ZWISCHEN OSTEOARTHROSE UND  
RHEUMATOIDER ARTHRITIS**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Marina Hedwig Bäuml

2017

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Georg Pongratz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. h.c. Joachim Grifka
Tag der mündlichen Prüfung:	20.07.2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Definition der Rheumatoiden Arthritis.....	9
1.2 Klinisches Bild .....	9
1.3 Ätiologie und Pathogenese .....	10
1.3.1 Präarthritische Phase.....	10
a) Genetik.....	10
b) Umwelteinflüsse .....	11
1.3.2 Toleranzverlust.....	11
a) Aktivierung des angeborenen Immunsystems.....	11
b) Aktivierung der adaptiven Immunantwort .....	12
1.3.3 Phase der klinisch manifesten Arthritis .....	15
a) Rolle der Fibroblasten .....	15
b) Rolle der Osteoklasten .....	17
c) Rolle der Zytokine.....	17
1.4 Neuroendokrine Faktoren und Rheumatoide Arthritis .....	20
1.4.1 Sexualhormone.....	20
a) Östrogene.....	21
b) Androgene.....	22
1.4.2 Adrenozeptoragonisten und -antagonisten .....	22
1.5 Kontrollgruppe.....	24
1.6 Ziel der Arbeit.....	24
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Patienten .....	25
2.2 Arbeitsbedingungen .....	25
2.3 Zellgewinnung .....	25
2.4 Zellkultivierung .....	26
2.5 Kryokonservierung und Auftauen von Fibroblasten.....	26
2.6 Stimulation der Fibroblasten.....	27
2.6.1 Vorbereitung der Substanzen zur Stimulation.....	27
2.6.2 Vorbereitung der Zellen und Stimulation .....	28

2.7 Messung.....	28
2.7.1 BAFF ELISA (kommerziell) .....	29
2.7.2 BAFF ELISA (selbst gecooatet) .....	29
2.7.3 IL-6 ELISA (kommerziell) .....	29
2.8 Statistische Analyse .....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1 Basale BAFF-Sekretion von SFs.....	31
3.2 IFN- $\gamma$ als Induktor der BAFF-Sekretion bei SFs .....	33
3.3 Einfluss der Zellpassage auf die BAFF-Sekretion von SFs .....	35
3.4 Einfluss von Poly(I:C) auf die BAFF-Sekretion von SFs.....	37
3.5 Einfluss von IL-10 auf die BAFF-Sekretion von SFs.....	39
3.6 Einfluss von Resiniferatoxin auf die BAFF-Sekretion von SFs .....	42
3.7 Einfluss von Adrenozeptoragonisten und -antagonisten auf die BAFF-Sekretion von SFs .....	45
3.8 Einfluss von Sexualhormonen auf die BAFF-Sekretion von SFs.....	47
3.8.1 DPN .....	47
3.8.2 PPT .....	49
3.8.3 G1 und/oder G15 .....	51
3.8.4 E2 und/oder ICI.....	54
3.8.5 Einfluss von E2 auf die BAFF-Sekretion bei verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ und zu verschiedenen Zeitpunkten.....	57
a) Zugabe von IFN- $\gamma$ und E2 zur gleichen Zeit .....	57
b) Zugabe von E2 fünf Stunden vor IFN- $\gamma$ .....	57
c) Zugabe von IFN- $\gamma$ fünf Stunden vor E2 .....	59
3.8.6 DHT und/oder Nilutamide.....	60
3.8.7 Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion bei verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ und zu verschiedenen Zeitpunkten.....	62
a) Zugabe von DHT und IFN- $\gamma$ zur gleichen Zeit .....	63
b) Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$ .....	65
c) Zugabe von IFN- $\gamma$ fünf Stunden vor DHT .....	71
3.9 Einfluss von IFN- $\gamma$ auf die IL-6-Sekretion von SFs .....	71
3.10 Zusammenfassung.....	73
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>74</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>

<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>7. Danksagung</b>	
<b>8. Erklärung</b>	
<b>9. Lebenslauf</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

ACPA	Antikörper gegen citrullinierte Proteinreste
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANOVA	Varianzanalyse
BAFF	B-Zell-aktivierender Faktor
BAFFR	BAFF-Rezeptor
BCMA	<i>B-Cell maturation antigen</i>
cAMP	zyklisches AMP
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMV	Zytomegalievirus
CRP	C-reaktives Protein
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHT	5- $\alpha$ -Dihydrotestosteron
E2	17- $\beta$ -Estradiol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER- $\alpha$	Östrogenrezeptor- $\alpha$
ER- $\beta$	Östrogenrezeptor- $\beta$
EULAR	<i>European league against rheumatism</i>
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
GPR30	G-Protein gekoppelter Rezeptor 30
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$



Ig	Immunglobulin
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKKβ	Inhibitoren der NF-κB-Kinase Untereinheit β
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinase
MAP3Ks	MAPK Kinase Kinasen
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MKKs	MAPK Kinasen
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mTOR	<i>mecanistic target of rapamycin</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OA	Osteoarthrose
OASFs	Fibroblasten von Patienten mit Osteoarthrose
PLC	Phospholipase C
p202	<i>lupus susceptibility modifier protein</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
RASFs	synoviale Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis
RF	Rheumafaktor
SFs	synoviale Fibroblasten
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>

TACI	<i>transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor</i>
Th1	T-Helferzelle Subtyp 1
Th17	T-Helferzelle Subtyp 17
Th2	T-Helferzelle Subtyp 2
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRAFs	<i>TNF receptor associated factors</i>
T <sub>REG</sub>	regulatorische T-Zelle
TRPV	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V</i>

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition der Rheumatoiden Arthritis

Die *Rheumatoide Arthritis* (RA) ist eine chronische Systemerkrankung, die sich lokal durch Entzündung der Gelenksynovialis und konsekutiver Arthritis äußert. Bei vielen Patienten manifestiert sich die Erkrankung zudem auch außerhalb der Gelenke (1). Trotz Behandlung führt das autoimmune Geschehen durch progressive Gelenkzerstörung und systemische Komplikationen (wie z. B. kardiovaskuläre Ereignisse) häufig zu fortschreitender Behinderung und hoher Mortalität (2–4). Die Erkrankung ist mit hohen sozioökonomischen Kosten verbunden. Im Jahr 2011 betrugen in Deutschland die Ausgaben für Medikamente und beruflichen Ausfall durchschnittlich ca. 18.000€ pro Patient (5, 6). Weltweit gesehen sind 0,24% der Bevölkerung betroffen, wobei die Prävalenz in Westeuropa mit 0,44% über dem globalen Durchschnitt liegt. Damit steht die RA an 42. Stelle der Krankheiten, die zur globalen Beeinträchtigung beitragen – direkt unter Malaria auf Platz 41 (7). All dies ist Grund für intensive Forschung nach Ursachen und neuen Therapiemöglichkeiten.

## 1.2 Klinisches Bild

Anfangs äußert sich die Erkrankung in vielen Fällen durch eine ausgeprägte Morgensteifigkeit der Gelenke und eine Arthritis der kleinen Hand- und Fußgelenke. Unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Nachtschweiß, subfebrile Temperaturen und Muskelschmerzen treten häufig auf. Im weiteren Verlauf ist eine symmetrische Arthritis vor allem kleiner Gelenke typisch (1). Es kommt früh zu Knochenabbau und Knorpelzerstörung, was Schmerzen und strukturelle Veränderungen mit sich bringt (1, 8). Beweglichkeit und Funktionalität der befallenen Gelenke sind durch irreversible Deformationen stark eingeschränkt (1). In etwa die Hälfte aller Patienten leidet innerhalb weniger Jahre nach Krankheitsbeginn bereits an systemischen Manifestationen, wobei kardiovaskuläre Komplikationen mit 27% am häufigsten auftreten gefolgt von Anämie und Osteoporose (9). Rheumaknoten als Zeichen der systemischen Beteiligung sind bei 20% - 30% der Patienten zu finden (10, 11). Auch verschiedene Organbeteiligungen (Perikarditis, Pleuritis, Glomerulonephritis usw.) kommen im Rahmen der entzündlichen Autoimmunerkrankung vor (10). Medikamentös versucht man, durch Glukokortikoide, andere Immunsuppressiva und mittels Biologika (zur Blockade von z. B. Zytokinen)

die Krankheitsaktivität zu kontrollieren (1). Obwohl neue therapeutische Maßnahmen eine deutliche Verbesserung der entzündlichen Veränderungen zeigten, hatten im Jahr 2011 in Deutschland nur 46% der Patienten eine niedrige Krankheitsaktivität (6, 12). Eine Heilung ist nach wie vor nicht möglich. Die Mortalität von Patienten mit RA ist noch immer höher als die der Normalbevölkerung, auch wenn neue Medikamente einen Rückgang der mit RA assoziierten Todesfälle bewirken konnten (4, 7). Durch frühzeitige Diagnose und Behandlung wird der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst (13). Da das seit Ende der achtziger Jahre verwendete *American College of Rheumatology* (ACR)-Klassifikationssystem frühe Stadien der RA nur unzureichend erkennt, wurde kürzlich ein neues Diagnostik-Schema (*ACR/EULAR-Kriterien*) eingeführt (14–16). Dies erlaubt eine deutlich frühere Diagnosestellung und gibt die Möglichkeit zu rechtzeitigem medikamentösen Eingreifen (17).

### **1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Der genaue Grund für die Entwicklung der RA ist nach wie vor ungeklärt. Mit verschiedenen Schemata wird versucht, die pathogenetischen Abläufe zu beschreiben. Nachfolgend wird auf das von McInnes und Schett postulierte Stufen-Modell bestehend aus präarthritischer Phase, Toleranzverlust und klinisch manifester Arthritis näher eingegangen (18).

#### **1.3.1 Präarthritische Phase**

In der präarthritischen Phase schafft ein komplexes Zusammenspiel zwischen genetischer Veranlagung und Umweltfaktoren die Voraussetzungen für die Entwicklung der entzündlichen Reaktion (18).

##### **a) Genetik**

60% des Risikos für die Entwicklung einer RA werden von genetischen Komponenten bestimmt (19). Den größten Anteil daran haben Allele des *major histocompatibility complex* (MHC)-Komplexes mit dem *shared epitope* (1, 20–22). Dies ist eine Aminosäuresequenz, die für etwa 30% des genetischen Risikos für die Manifestation einer RA verantwortlich ist (1, 22, 23). Aktuell sind zudem mehr als hundert nicht MHC *single nucleotide polymorphisms* bekannt, die das Risiko für die Entwicklung einer RA, wenn auch nur moderat, erhöhen (1, 24). Aber auch epigenetische Veränderungen der DNA wie posttranslationale Histonmodifikation

oder Promotor-Methylierung können das Risiko für die Entwicklung einer RA beeinflussen (25).

### **b) Umwelteinflüsse**

Da jedoch nicht alle genetisch vorbelasteten Personen erkranken, müssen auch Umweltfaktoren an der Entstehung der RA beteiligt sein. So haben z. B. Raucher ein etwa zweifach höheres Risiko für die Entwicklung einer seropositiven RA als Nichtraucher (26). In Kombination mit der genetischen Veranlagung für die autoimmune Reaktion steigt das Risiko einer manifesten Erkrankung sehr stark an. Bei Rauchern mit zwei Kopien des *shared epitope* tritt 36-fach häufiger eine *anticitrullinated protein antibodies* (ACPA) positive RA auf als bei Nichtrauchern ohne die entsprechenden Allele (27). Des Weiteren erhöht Übergewicht die Wahrscheinlichkeit zu erkranken (28). Ebenso bahnen vermutlich Infektionen mit Erregern wie *Eppstein-Barr-Virus* (EBV), *Zytomegalievirus* (CMV) oder *Escherichia coli* die chronische Entzündung aufgrund partieller Ähnlichkeit mit körpereigenen Antigenen (18). Zudem sind die Zusammensetzung der gastrointestinalen bakteriellen Flora und parodontale Infektionen mit *Porphyromonas gingivalis* mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer RA (18, 29, 30). Damit assoziiert sind weiterhin ungünstige Lebensereignisse und Stress aufgrund des Zusammenhangs zwischen entzündlichem Geschehen und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (31). Mikrovaskuläre Veränderungen, neurologische Ereignisse sowie biomechanische Schädigungen und Mikrotraumata können ebenfalls zur Initiierung des Krankheitsprozesses beitragen (18).

## **1.3.2 Toleranzverlust**

### **a) Aktivierung des angeborenen Immunsystems**

Als erster pathogenetischer Schritt in der Entwicklung der autoimmunen Reaktion gilt die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems (3, 18). Die in Synovialmembran und -flüssigkeit physiologischerweise vorhandenen Effektorzellen der konnatalen Immunantwort (z. B. Makrophagen, Mastzellen, *natürliche Killerzellen* (NK-Zellen), neutrophile Granulozyten) erkennen Stimuli wie beispielsweise die RNA nekrotischer Zellen durch *pattern recognition receptors* (z. B. *toll-like receptors* (TLRs)) und werden aktiviert (18, 32, 33). Eine zentrale Rolle spielen dabei Makrophagen. Ihre große Anzahl im entzündeten Gelenk macht sie zu einem

Hauptmediator der durch das angeborene Immunsystem initiierten Reaktion. Sie setzen nach Aktivierung proinflammatorische Zytokine wie z. B. den *Tumornekrosefaktor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) und verschiedene *Interleukine* (IL) frei und werden zu Phagozytose und Antigenpräsentation angeregt. Dadurch können sie weitere Zellen chemotaktisch in die synovialen Strukturen locken, die Sekretion von Matrix-degradierenden Enzymen verstärken und die Differenzierung von dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Zellen und weiteren mesenchymalen Zellen in antigenpräsentierende Zellen fördern (34). Ähnliche Aktivierungs- und Reaktionsmuster finden sich auch bei neutrophilen Granulozyten und Mastzellen (35, 36).

Dendritische Zellen werden zu potenten antigenpräsentierenden Zellen und wandern in die regionären Lymphknoten, wo sie naive T-Zellen und damit das adaptive Immunsystem aktivieren können (3).

## **b) Aktivierung der adaptiven Immunantwort**

### Rolle der T-Zellen

In den regionären Lymphknoten findet sich eine große Zahl von reifen, aber noch naiven T-Zellen, die entweder einen *cluster of differentiation 8 positiven* (CD8<sup>+</sup>) oder einen CD4<sup>+</sup> Phänotyp besitzen. Der T-Zell-Rezeptor in Verbindung mit der CD8<sup>+</sup>-Untereinheit kann auf MHC-I präsentierte Antigene erkennen. Im Gegensatz dazu binden die CD4<sup>+</sup> Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den MHC-II Antigen-Komplex und können sich anschließend abhängig vom lokalen Zytokinmilieu in verschiedene Subtypen differenzieren (*T-Helferzellen der Subtypen 1, 2, 17* (Th1, Th2, Th17), *regulatorische T-Zellen* (T<sub>REG</sub>)) (1, 37–40).

Im Folgenden werden die einzelnen T-Zell-Untereinheiten und ihre Rolle bei der RA kurz erläutert:

- o Den zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde bisher eine unwesentliche, hauptsächlich protektive Rolle bei der RA zugesprochen. Bisher ist die Datenlage dazu jedoch gering und teilweise widersprüchlich (41).
- o Die in Lymphknoten oder Mukosa durch z. B. dendritische Zellen aktivierten T-Lymphozyten sind überwiegend CD4<sup>+</sup> und erkennen auf MHC-II präsentierte Peptide (1, 3). MHC-II wird u. a. durch das *shared epitope* codiert (1). Da dies wie bereits

beschrieben für einen Großteil der Veranlagung bzgl. der RA verantwortlich ist (1), müssen auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufgrund des eben beschriebenen Zusammenhangs eine zentrale Rolle bei der autoimmunen Reaktion haben (42).

- o Die Th1- und Th2-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der B-Zell Aktivierung und der Zytokinproduktion (1). Bei Patienten mit RA liegt dabei ein Überschuss von Th1- im Vergleich zu Th2-Zellen vor, wobei der Grad des Ungleichgewichts positiv mit der Krankheitsaktivität korreliert (43, 44). Somit gibt es in der Synovia einen Überschuss an Th1-Mediatoren wie z. B. *Interferon-γ* (IFN-γ), während im Verhältnis dazu zu wenig Th2-Zytokine wie IL-10 vorhanden sind (37, 43, 44).

- o Auch die IL-17 produzierenden Th17-Zellen sind für die Pathogenese der RA wichtig. Verschiedene epigenetische Veränderungen führen zu erhöhter Produktion von IL-17, was die Produktion weiterer proinflammatorischer Faktoren und Überleben sowie Reifung von Synoviozyten und Immunzellen steigern kann. Dadurch wird wiederum ein positiver Feedbackmechanismus mit verstärkter Differenzierung von Th17-Zellen induziert (45).

- o Die letzte Gruppe, die T<sub>REG</sub>-Zellen, stellen ca. 5 – 7% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bei Gesunden können sie die Immunantwort durch eine Vielzahl von kontaktabhängigen und kontaktunabhängigen Mechanismen, die noch nicht im Einzelnen geklärt sind, vermindern (40). Vermutlich gelingt ihnen bei Patienten mit RA die Unterdrückung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF nur unzureichend (46). Der Einsatz von T<sub>REG</sub>-Zellen für die Behandlung der RA wird diskutiert (47).

### Rolle der B-Zellen

Dass neben T- auch B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA spielen, wurde unter anderem dadurch deutlich, dass bei RA-Patienten meist Autoantikörper nachweisbar sind (1). Zum einen ist dies der *Rheumafaktor* (RF) (1, 48). Dieser besteht aus Antikörpern gegen Teile von *Immunglobulinen* (Ig) und ist bei 80% der Patienten nachweisbar (1, 49). Auch bei Gesunden kann der RF vorkommen (1). Als diagnostisch und prognostisch bedeutsamer gelten ACPAs, die bei der RA eine Spezifität von 95% aufweisen (50). Ihr Auftreten ist mit einem aggressiven Krankheitsverlauf verbunden (51). Zwar kommt auch bei Gesunden eine Citrullinierung von Argininresten als Folge diverser Umwelteinflüsse vor, es

entwickeln sich aber in der Regel keine Antikörper gegen diese modifizierten Proteine (52). Besonders das Rauchen ist mit der Bildung von ACPAs assoziiert (53).

Beiden erwähnten Markern (ACPAs und RF) ist gemeinsam, dass sie als Antikörper gegen körpereigene Strukturen von B-Zellen produziert werden (1). Außerdem ist auffällig, dass nach B-Zell-Depletion eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptomatik bei RA-Patienten festzustellen ist (54). Die pathogenetische Bedeutung der B-Zellen ergibt sich vor allem durch die Funktionen Antikörperproduktion, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion (55).

#### *Produktion von Autoantikörpern*

In der B-Zell-Entwicklung erkennen zunächst zwischen 55% und 75% aller unreifen Vorstufen körpereigene Strukturen (56). Bei Gesunden gehen diese im Normalfall zugrunde. Bei Patienten mit RA bewirken jedoch verschiedene Zytokine wie z. B. der *B-Zell aktivierende Faktor* (BAFF) das verstärkte Überleben autoreaktiver B-Zellen und provozieren so die Entwicklung der entzündlichen Reaktion (55). Neben den oben genannten zwei sehr bekannten Laborparametern ACPAs und RF sind in der Synovia noch eine Vielzahl weiterer Autoantikörper zu finden (1, 57).

#### *Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung*

Die reifen B-Zellen präsentieren Antigene an T-Helferzellen und sind somit wesentlich an der Regulation der T-Zell-Funktionen beteiligt (1, 55). Im Gegenzug können die T-Zellen durch Sekretion von Zytokinen die B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen (1). Zur Aktivierung von T-Zellen durch z. B. B-Zellen sind mehrere Schritte nötig. Zuerst muss der T-Zell-Rezeptor die auf MHC-II der B-Zellen (B-Zell-Rezeptor) präsentierten Antigene erkennen. Anschließend wird dieses erste Signal durch ein kostimulatorisches Signal bestätigt, indem es zu einer Interaktion zwischen CD28 auf der T-Zelle und CD80/86 auf der B-Zelle kommt (55). Dieser Prozess kann medikamentös unterdrückt werden. So greift z. B. das Medikament Abatacept gezielt in den Prozess der CD28-Kostimulation ein (58).

#### *Zytokinproduktion*

B-Zellen können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine produzieren, durch die sie u. a. die Anzahl und den Subtyp von T-Zellen regulieren können (59, 60).



### *Regulatorische Funktionen*

Tierstudien zeigten, dass B-Zellen immunsuppressive Funktionen ausüben können, welche vor allem durch IL-10 vermittelt werden. Hauptsächlich scheinen Antikörperproduzierende B-Zellen durch Sekretion dieses Zytokins entzündungshemmend zu wirken (61).

### **1.3.3 Phase der klinisch manifesten Arthritis**

#### **a) Rolle der Fibroblasten**

Um von der Phase des aktivierten Immunsystems zur klinisch manifesten Arthritis zu gelangen, sind unter anderem Interaktionen zwischen den bereits beschriebenen Effektorzellen des Immunsystems und *synovialen Fibroblasten* (SFs) von großer Bedeutung (3).

Physiologischerweise sind die SFs ein wichtiger Bestandteil der die Synovialflüssigkeit umgebenden Zellschicht. Diese besteht aus ein bis zwei Lagen von SFs (auch Typ-B-Synoviozyten genannt), zwischen denen Makrophagenähnliche Zellen (Typ-A-Synoviozyten) eingelagert sind. Da in diesem Verbund *tight junctions* und eine Basalmembran fehlen, können die Zellen leicht mit der Synovialflüssigkeit kommunizieren. Sie stammen vom Mesenchym ab, exprimieren Proteine der extrazellulären Matrix (Vimentin, Kollagen Typ IV und V), Enzyme zur Degradation der extrazellulären Matrix und Inhibitoren derselben. Im normalen Gelenk stehen Synthese und Abbau im Gleichgewicht, sodass durch die SFs die Integrität der synovialen Strukturen aufrechterhalten wird (62).

SFs exprimieren TLRs, üben mit B- und T-Zellen gegenseitige Interaktionen aus und können über Zytokinsekretion viele weitere Prozesse der Immunantwort induzieren oder verstärken (3, 63, 64).

Bei Patienten mit RA gibt es bei den SFs diverse Veränderungen. Zum einen sind molekulare Abweichungen zu finden, wie sie auch bei der Tumorentstehung nachweisbar sind (Mikrosatelliteninstabilität sowie Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen) (62). Außerdem findet sich bei den SFs ein verändertes epigenetisches Muster im Vergleich zu Zellen von Patienten mit *Osteoarthritis* (OA) (65).

Daneben sind auch Abweichungen bei der Regulation verschiedener Signalwege feststellbar (62). Die wichtigsten werden im Folgenden erläutert:

#### *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B)-Signalweg

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg ist einer der Hauptregulatoren der proinflammatorischen Zytokinproduktion und wird z. B. durch IL-1, TNF und TLRs aktiviert (62). Diese Mediatoren induzieren die Phosphorylierung von *Inhibitoren der NF- $\kappa$ B-Kinase Untereinheit  $\beta$*  (IKK $\beta$ ) (62, 66). Die Aktivierung von IKK $\beta$  führt zur Phosphorylierung von Proteinen der *Inhibitor von NF- $\kappa$ B* (I $\kappa$ B) Familie. Diese bilden zuvor Komplexe mit zytosolischen Untereinheiten von NF- $\kappa$ B und halten sie im inaktiven Status. Nach Phosphorylierung werden I $\kappa$ B-Proteine im Proteasom degradiert. Dadurch kann NF- $\kappa$ B in den Kern migrieren und dort die entsprechende Gentransduktion induzieren (62, 67). In *SFs von RA-Patienten* (RASFs) führen diverse Veränderungen zur verstärkten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Weges und damit zur gesteigerten proinflammatorischen Zytokinproduktion (62).

#### Verändertes Apoptoseverhalten

Durch Überexpression antiapoptotischer Faktoren, veränderte Antwort auf Ligandenbindung an apoptoseregulierende Rezeptoren, Abnormalitäten in apoptosespezifischen Wegen und weitere Resistenzmechanismen gegen Apoptose kommt es zu einem verstärkten Überleben der genetisch veränderten SFs (62).

#### Veränderter *Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kaskade* (MAPK)-Signalweg

Durch Aktivierung des MAPK-Signalweges werden Matrix-Metalloproteinasen und Zytokine produziert. Die Signaltransduktion beinhaltet die Aktivierung von drei verschiedenen Kinasen. Dies sind zum einen die *MAPK Kinase Kinasen* (MAP3Ks), zudem die *MAPK Kinasen* (MKKs) und die MAPK. Wenn MAPKs durch MKKs phosphoryliert werden, können MAPKs in den Kern migrieren, wo sie entsprechende Transkriptionsfaktoren aktivieren. Molekulare Veränderungen der SFs bewirken eine vermehrte Aktivierung dieses Signalweges (62, 68).

Durch oben beschriebene Anomalien können die SFs einen destruierend wachsenden Zellpannus bilden. Der Überschuss an degradierenden Enzymen durch die veränderten SFs bewirkt eine Knorpel- und Knochenzerstörung (62). Aufgrund dieser Prozesse wird die RA klinisch manifest (18).

### **b) Rolle der Osteoklasten**

Neben den oben genannten Fibroblasten tragen auch Osteoklasten zur Gelenkdestruktion bei, deren Differenzierung und Migration in Knorpelnähe durch synoviale Zytokine, vor allem *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) gefördert wird (18, 69). Zudem werden diese Prozesse durch andere Mediatoren wie TNF, IL-1, IL-6 und vermutlich auch IL-17 verstärkt. Die Osteoklasten können mittels ihrer degradierenden Enzyme sowohl den mineralisierten Knorpel als auch den subchondralen Knochen zerstören (70). Vor allem mechanisch stark beanspruchte und inkongruente Gelenkflächen sind anfällig für die entzündlichen Veränderungen (71). Der Verlust der kortikalen Knochensubstanz erlaubt den entzündlichen Zellaggregaten zudem einen Einbruch ins Knochenmark, wo mit progredientem Krankheitsverlauf immer mehr T- und B-Zell Verbände zu finden sind (72). Bei bis zu 80% aller Patienten ist bereits im ersten Jahr nach Diagnosestellung ein Verlust von Knochensubstanz feststellbar (8).

### **c) Rolle der Zytokine**

Viele RA-Patienten leiden unter systemischen Manifestationen der Erkrankung (1). Diese werden durch Zytokine vermittelt. In den vorausgegangenen Kapiteln wurden einige im Zusammenhang mit Zell-Zell-Interaktionen (TNF, IL-1, IL-4 usw.) bereits erwähnt. Folgende Mediatoren wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht:

#### **IL-6**

Der Serumspiegel des Zytokins IL-6 korreliert bei Patienten mit RA positiv mit der Krankheitsaktivität (73). In den ersten 12 Monaten der medikamentösen Therapie hat dies prognostische Bedeutung (je niedriger der IL-6 Wert, umso günstiger der klinische Verlauf) (74). Durch erfolgreiche Therapie kann der Spiegel gesenkt werden, was eine Verbesserung der klinischen Symptomatik nach sich zieht (75).

IL-6 ist ein Zytokin mit vielen verschiedenen Effektormechanismen. So kann es z. B. die Differenzierung von aktivierten B-Zellen in Antikörper produzierende Plasmazellen fördern und in der Leber die Synthese von Akut-Phase-Proteinen induzieren (75).

IL-6 übt seine biologische Wirkung zum einen am membrangebundenen IL-6-Rezeptor aus, welcher jedoch nur von wenigen Zellarten wie z. B. Hepatozyten oder Neutrophilen exprimiert wird. Nach Bindung an den Rezeptor kommt es zur

Signaltransduktion, was zu einer Aktivierung von *Janus-Kinase* (JAK) gekoppelten Transduktionsmechanismen führt. Dies wird als „klassischer Weg“ bezeichnet und endet vermutlich in der Produktion von anti-inflammatorischen Mediatoren. Bisher wurde IL-6 im Zusammenhang mit der RA jedoch immer als proinflammatorisches Zytokin betrachtet. Diese Effekte werden über einen anderen Signalmechanismus vermittelt: Im Plasma liegt eine lösliche Form des IL-6-Rezeptors vor, die nach Bindung des Liganden eine Signalkaskade in den meisten Zellen auslösen kann, die keinen eigenen IL-6-Rezeptor exprimieren. Die Endstrecke mündet schließlich in der Förderung von proinflammatorischen Stimuli (75–77).

Bei Patienten mit RA überwiegen letztgenannte Effekte. So wird z. B. die Differenzierung von Th17-Zellen auf Kosten von T<sub>REG</sub>-Zellen gefördert, denen, wie oben bereits beschrieben, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA zugeschrieben wird (78, 79). Weiterhin ist IL-6 an der lokalen, entzündlich-destruierenden Reaktion beteiligt. Es verstärkt die Leukozytenmigration in die Synovialis und trägt zu gesteigerter Angiogenese bei (80, 81). Durch Förderung der Osteoklastenaktivität kommt es zu Knochenabbau und Osteoporose (7, 82, 83). Auch an der Knorpelzerstörung ist es über Induktion der Produktion von *Matrix-Metalloproteinasen* (MMPs) beteiligt (84).

Doch nicht nur lokale Effekte bei RA-Patienten sind IL-6 vermittelt. Systemische Folgen hoher IL-6 Spiegel sind u. a. Anämie, Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse und steigende Produktion der Akut-Phase-Proteine *C-reaktives Protein* (CRP) und Serum Amyloid A (85–87).

## IL-10

IL-10 ist ein antiinflammatorisch wirkendes Zytokin, welches die Funktionen von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen inhibieren kann. Weiterhin ist es an der Differenzierung von T<sub>REG</sub>-Zellen beteiligt (88). Zudem können auch B-Zellen IL-10 sezernieren und somit immunsuppressiv wirken (61). Bei Patienten mit RA wurde eine inverse Korrelation zwischen der Zahl dieser IL-10 produzierenden B-Zellen und der Krankheitsaktivität gefunden (89), was auf die wichtige Rolle von IL-10 in der Pathogenese der RA hinweist.

## IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  gehört zur Familie der Typ-II Interferone und gilt als Zytokin mit „proinflammatorische[r] und immunmodulatorische[r] Rolle“ (90). Es wird sowohl von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems sezerniert und hat eine Vielzahl biologischer Wirkungen (91). Dazu gehören u. a. die Induktion von Komponenten der Komplementkaskade, Beeinflussung von Leukozyten-Endothel-Interaktionen und Apoptosevorgängen sowie Regulation der Expression von MHC-II Molekülen (92). Vermittelt werden diese Effekte über den IFN- $\gamma$  Rezeptor, der aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit besteht. Die meisten Zellen exprimieren konstitutiv die  $\alpha$ -Kette, während die  $\beta$ -Untereinheit durch externe Stimuli nur bei manchen Zelltypen hochreguliert werden kann (93). Nach Bindung von IFN- $\gamma$  wird die Signaltransduktion über den *Janus-Kinase / signal transducers and activators of transcription* (Jak/Stat)-Weg eingeleitet und so die Genexpression reguliert (94). Bei der RA hat das Zytokin eine duale Rolle. Zum einen wirkt es proinflammatorisch über Stimulation der Proliferation und Fähigkeit zur Antigenpräsentation von SFs (95, 96). Auch die Produktion des nachfolgend beschriebenen BAFF wird durch IFN- $\gamma$  gesteigert (97). Hingegen scheint IFN- $\gamma$  in frühen Phasen der RA durch Minderung der Produktion von MMPs für die Knorpelsubstanz protektiv zu wirken (98, 99). „In der Synovialflüssigkeit von Patienten aus einem sehr frühen Stadium der RA kann im Gegensatz zu dem Th2-Zytokin IL-4 kaum IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden, was seine Beteiligung an der initialen Phase der RA infrage stellt. Weiterhin weisen mit rekombinantem IFN- $\gamma$  behandelte Patienten in Ende der 1980er Jahre durchgeführten klinischen Studien eine gewisse Verbesserung [...] auf“ (90). In das Bild eines antientzündlichen Effektes von IFN- $\gamma$  passt auch, dass Mäuse mit defektem IFN- $\gamma$ -Rezeptor anfälliger für eine Modellarthritis sind (100).

## BAFF

Ein weiteres wichtiges Zytokin für die Pathogenese der RA ist BAFF. Dieses gehört zur Familie der Tumornekrosefaktoren und ist ein homotrimeres Typ-II Transmembranprotein. Durch dessen Prozessierung entsteht das lösliche BAFF. Nach Spaltung kann es die für TNF-Faktoren übliche trimere Struktur annehmen, für die Einleitung der Signaltransduktion kann jedoch auch ein 60mer erforderlich sein (101). Zurzeit sind drei verschiedene BAFF-Rezeptoren bekannt: *B cell maturation antigen* (BCMA), *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin*

*ligand interactor* (TACI) und *BAFF receptor* (BAFFR). Nach Rezeptorbindung leiten intrazelluläre Proteine, sog. *TNF receptor associated factors* (TRAFs), die Signaltransduktion ein (101). Bindet BAFF an TACI, wird durch TRAF2 oder TRAF6 der klassische NF- $\kappa$ B1 Transkriptionsweg induziert. BAFFR rekrutiert ausschließlich TRAF3. Nach Ligandenbindung wird TRAF3 degradiert, was zu verstärkter Aktivität des alternativen NF- $\kappa$ B2-Weges führt (101). Im Gegensatz dazu ist die Interaktion zwischen BAFF und BCMA nur sehr schwach ausgeprägt (102). Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Weges führt zu erhöhter Produktion antiapoptotischer Proteine (103). Zudem kann BAFF über andere Signalwege die Glykolyse, Proteinsynthese und das Zellwachstum stimulieren (101). Diese Eigenschaften machen BAFF zu einem wichtigen Überlebensfaktor für B-Zellen. Vermutlich kommt es durch BAFF-Überschuss zu einer positiven Selektion von wenig affinen autoreaktiven B-Zellen. Die Rezeptoren für BAFF werden allerdings erst so spät in der Zellreifung exprimiert, dass zu diesem Zeitpunkt stark autoreaktive Zellen bereits durch Apoptose zugrunde gegangen sind (101, 104). Des Weiteren stimuliert BAFF die T-Zell-unabhängige Aktivierung von B-Zellen (101).

In der Synovia von Patienten mit RA produzieren sowohl T- als auch B-Zellen BAFF und BAFFR. Bei SFs konnte nach Passagierung zytoplasmatisches BAFF nachgewiesen werden (105). Zudem exprimieren SFs BCMA (106). Auch wenn die durch SFs induzierte Apoptoseresistenz von B-Zellen vermutlich nicht von BAFF abhängig ist, spielt BAFF dennoch eine wichtige Rolle bei Patienten mit RA (105). So können die SFs z. B. den Antikörperklassenwechsel zu IgG hin direkt durch BAFF induzieren (107). Außerdem findet man bei Patienten mit systemisch-rheumatischen Erkrankungen erhöhte BAFF-Spiegel, die zum Teil auch mit der Krankheitsaktivität korrelieren (108, 109). Bei Patienten mit Lupus erythematosus wird z. B. der anti-BAFF-Antikörper Belimumab erfolgreich eingesetzt (110).

## **1.4 Neuroendokrine Faktoren und Rheumatoide Arthritis**

### **1.4.1 Sexualhormone**

Verschiedene Beobachtungen lassen einen Einfluss von Sexualhormonen auf die Pathogenese der RA vermuten. So ist z. B. die Prävalenz bei Frauen doppelt so hoch wie bei Männern, wobei sich das Verhältnis weiblich zu männlich mit steigendem Lebensalter angleicht (7, 111). Die meisten Frauen erkranken dabei

während der Menopause (111). Schwangere Patientinnen erfahren in ca. 75% der Fälle eine deutliche Symptomverbesserung, wohingegen nach der Geburt in der Regel wieder eine Verschlimmerung festzustellen ist (112, 113). Zudem ist das Östrogen/Androgen-Verhältnis in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit RA stark in Richtung Östrogene verschoben (114).

#### **a) Östrogene**

Klassischerweise binden die weiblichen Geschlechtshormone an die *Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$*  (ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ ), deren Verteilung je nach Gewebeart variiert (115–117). Nach Ligandenbindung dimerisieren die Rezeptoren und migrieren in den Zellkern, wo sie nach Bindung an *estrogen-response-elements* mit gewisser zeitlicher Verzögerung die Transkription von Genen initiieren (117, 118). Allerdings können Östrogene Effekte auch direkt über den *G-Protein gekoppelten Rezeptor 30* (GPR30) vermitteln. Dessen Aktivierung führt zur Hochregulation bestimmter Signalwege, die u. a. zu verstärkter Produktion von MMPs, *zyklischem AMP* (cAMP) oder *Phospholipase C* (PLC) führen. So können Östrogene auch Gene aktivieren, die keine *estrogen-response-elements* besitzen (119).

Sowohl Zellen des angeborenen wie auch des erworbenen Immunsystems exprimieren Östrogenrezeptoren und können folglich durch die entsprechenden Liganden moduliert werden (120). Islander et al. fassen die Folgen zusammen:

Neutrophile Granulozyten werden in ihrer Funktion gestört. Zudem nimmt ihre Anzahl im Blut ab. Außerdem werden weniger Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF- $\alpha$  produziert. Auch die NK-Zellen werden in ihrer Aktivität gemindert (117).

Das adaptive Immunsystem ist durch eine gestörte T-Lymphopoese, vermehrte Differenzierung von T<sub>REG</sub>-Zellen und durch Stimulation der Antikörperproduktion von den Östrogeneinflüssen betroffen. Außerdem werden B-Zellen seltener apoptotisch. Vergleicht man die Einflüsse auf verschiedene immunregulatorische Zellen fällt auf, dass Östrogeneinfluss zu verminderter T-Zell-, aber gesteigerter humoraler Immunantwort führt (117).

Demnach hat das Hormon je nach Umgebung sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen (120).

## **b) Androgene**

Androgene wie zum Beispiel Testosteron und *5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron* (DHT) haben eine allgemein antientzündliche und immunsuppressive Wirkung (121, 122). Testosteron z. B. vermindert die Produktion von IL-6 und IL-1 sowie die Aktivität der NK-Zellen (121). Die Stimulation von Fibroblasten mit DHT bewirkt zudem eine verringerte Aktivität des IL-6-Genpromotors (123). Ebenfalls wichtig für die Pathogenese der RA sind die Hormone *Dehydroepiandrosteron* (DHEA) und dessen Vorstufe *Dehydroepiandrosteronsulfat* (DHEAS). „DHEA ist das aktive Hormon und kann in peripheren Zellen wie den Makrophagen in Androgene umgewandelt werden“ (121). DHEA bewirkt eine verminderte Sekretion von IL-1, IL-6, TNF und von Sauerstoffradikalen (121).

Das bei der RA vorhandene Zytokinmilieu bewirkt eine verminderte Produktion von Androgenen in exokrinen Drüsen, aber auch eine verstärkte Konversion von Androgenen in Östrogene (114, 124). Letzteres wird zum Beispiel durch TNF stimuliert (125). Zudem wird ebenfalls TNF-vermittelt die Umwandlung von DHEAS zu DHEA geblockt (126). Daraus resultieren verminderte Androgenspiegel in Serum und Synovialflüssigkeit (114, 127, 128).

### **1.4.2 Adrenozeptoragonisten und -antagonisten**

Stress und ungünstige Lebensereignissen gelten als Risikofaktoren für die RA. Dies liegt vor allem an den engen Beziehungen zwischen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse, dem sympathischen Nervensystem und dem Immunsystem (31). Das sympathische Nervensystem und seine Transmitter wirken dabei über Adrenozeptoren (129).

Adrenozeptoren sind Transmembranproteine, die nach Agonistenbindung eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade auslösen. Je nach Struktur und genauem molekularen Funktionsmechanismus lassen sich diese in fünf verschiedene Subgruppen einteilen ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ). „Die  $\alpha_1$ -Rezeptoren vermitteln ihre Wirkung durch die Aktivierung des Phospholipase C / Inositoltriphosphat-Weges, der zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt. Die  $\alpha_2$ -Rezeptoren koppeln über ein inhibitorisches G-Protein an die Adenylatzyklase und senken den cAMP-Spiegel. Die  $\beta$ -Rezeptoren koppeln an ein stimulierendes G-Protein, aktivieren die Adenylatzyklase und erhöhen den cAMP-Spiegel“ (130). „Niedrige physiologische



Konzentrationen von Noradrenalin binden präferentiell an  $\alpha$ -Adrenozeptoren [...] und hohe physiologische Konzentrationen binden auch an  $\beta$ -Adrenozeptoren [...]“ (121).

Hohe Spiegel sympathischer Neurotransmitter ( $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$ M) - wie sie zum Beispiel direkt an den sympathischen Nervenendigungen zu finden sind - bewirken deshalb durch Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren eine Steigerung des intrazellulären cAMP und in der Folge eine verminderte Ausschüttung von Zytokinen wie IL-2, IL-12, TNF und IFN- $\gamma$  (121). Zudem werden mehr antiinflammatorische Th2-Mediatoren ausgeschüttet (121). Bei Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis konnte durch die Stimulation von  $\beta_2$ -Rezeptoren eine deutliche dosisabhängige Verminderung der Krankheitsaktivität beobachtet werden, was auf die reduzierte Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF zurückgeführt wurde (131). Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn im Gelenk genügend sympathische Nervenfasern und folglich genug hohe Transmitterkonzentrationen vorhanden sind (121). Bei Patienten mit RA konnte aber gezeigt werden, dass vermutlich als Folge der von Makrophagen und Fibroblasten sezernierten Mediatoren im entzündeten Gelenk die Zahl der sympathischen Nervenfasern zugunsten sensibler Fasern abnimmt (124, 132). Zudem waren im Tiermodell eine deutlich verringerte  $\beta_2$ -Rezeptordichte und das verminderte Ansprechen der Rezeptoren auf Stimulation zu beobachten. Bei sehr schwerem Krankheitsverlauf war der  $\beta_2$ -Rezeptorstatus so eingeschränkt, dass Agonisten keine cAMP-Erhöhung mehr bewirken konnten (133).

Die erwähnten Vorgänge im entzündlichen Milieu führen zur vermehrten Stimulation von  $\alpha$ -Adrenozeptoren. Vor allem die reduzierte Transmitterkonzentration aufgrund der Abnahme der sympathischen Fasern trägt dazu bei. Über Aktivierung von  $\alpha_2$ -Rezeptoren wird nun die cAMP-Konzentration vermindert, was wiederum eine gesteigerte Produktion des proinflammatorischen Neurotransmitters TNF mit sich bringt (121). Weiterhin werden von Makrophagen durch Stimulation ihrer  $\alpha_1$ -Rezeptoren verstärkt Komplementfaktoren produziert (134). Allerdings nimmt bei Patienten mit RA nicht nur die Zahl der sympathischen Nervenfasern im Gelenk ab, sondern es ist auch die Rezeptorzusammensetzung auf Immunzellen und synovialen Zellen verändert (135, 136). Im Vergleich zu Gesunden sind weniger  $\beta$ -Rezeptoren vorhanden (137). All dies führt zur verstärkten Stimulation von  $\alpha$ -Rezeptoren und über die bereits geschilderten Mechanismen zu einer Verschlechterung des klinischen Bildes.

Medikamentös kann in diesen Prozess eingegriffen und der antiinflammatorische Effekt des sympathischen Nervensystems ausgenutzt werden.  $\beta$ -Agonisten können demnach über diesen Mechanismus eine Verbesserung der klinischen Symptomatik bei RA-Patienten bewirken (121). Auch durch systemische Medikation wie z. B. Methotrexat wird über Erhöhung der Adenosinkonzentration und in Folge einer Steigerung von cAMP ein antiinflammatorischer Effekt erzielt (138).

### **1.5 Kontrollgruppe**

Als Kontrolle wurde in dieser Arbeit Material von Patienten mit OA verwendet. Diese Erkrankung hat genau wie die RA eine Destruktion von Gelenkstrukturen durch eine lokale inflammatorische Reaktion zur Folge, welche hauptsächlich durch mechanische Faktoren ausgelöst wird. Im Unterschied zur RA hat die Entzündung dabei keine so starke systemische Komponente, ist weit weniger ausgeprägt und nicht durch Autoimmunität gekennzeichnet (52).

### **1.6 Ziel der Arbeit**

Wie oben beschrieben stellt die Aktivierung von B-Zellen einen essentiellen pathogenetischen Schritt in der Entwicklung und Chronifizierung der RA dar. Das Zytokin BAFF spielt vor allem für das Überleben der B-Zellen eine wichtige Rolle. Wie Vorarbeiten zeigten, können SFs zur BAFF-Produktion angeregt werden (139–141). Da sie damit zu einer möglichen wichtigen Quelle dieses Zytokins bei der RA werden, wurde in dieser Arbeit die Stimulierbarkeit von RASFs und *Fibroblasten von Patienten mit OA* (OASFs) bezüglich der BAFF-Sekretion untersucht. Weiterhin gelten neuroendokrine Stimuli und Entzündungsmediatoren als wichtige Einflussfaktoren für die RA. Dies wird z. B. in der geschlechtsspezifischen Prävalenz oder auch der Stressabhängigkeit deutlich (31, 111). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss neuroendokriner Substanzen und diverser Zytokine auf die BAFF Sekretion durch SFs und somit indirekt auf die B-Zell-Funktion untersucht.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Die kultivierten Zellen für sämtliche Versuche stammten von Patienten, die bei einem elektiven Eingriff einen künstlichen Kniegelenkserersatz erhielten. Sie waren über die Verwendung des abgetragenen Gewebes für Forschungszwecke aufgeklärt und hatten dafür ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie war zuvor durch die Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt worden.

Patienten mit seit langem manifester RA gemäß den Kriterien des ACR bildeten die Versuchsgruppe (14). Als Kontrolle wurde Material von Patienten mit OA verwendet.

### **2.2 Arbeitsbedingungen**

Um Kontamination und Schädigung des abgetragenen Materials und der daraus gewonnenen Fibroblasten zu verhindern, wurden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.3 Zellgewinnung**

Unmittelbar nach der Gewinnung wurde das aus dem geschädigten Kniegelenk ausgeschälte Synovialgewebe im Operationssaal in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gegeben und auf Eis ins Labor transportiert. Etwa eine Stunde nach der Operation erfolgte die nachfolgend beschriebene Weiterverarbeitung.

Dazu wurde das Gewebestück direkt nach Entnahme aus der Transportflüssigkeit zügig mit einem Skalpell zerkleinert. Die so erhaltenen Teile wurden anschließend in ca. 25ml entsprechend der Herstelleranleitung verdünnter Liberase (Liberase TM Research Grade, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Um die Enzymaktivität der Liberase zu stoppen und damit eine zu starke Aufspaltung des Gewebes zu verhindern, wurden anschließend 20ml PBS zugegeben. Damit nachfolgend die einzelnen Zellen aus der erhaltenen Suspension abgetrennt werden konnten, wurde diese durch ein 70µm Zellsieb passiert und anschließend für 8min bei 4°C und 300g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in 5ml Erythrozyten-Lyse-Puffer (Buffer EL, Venlo, Niederlande) gelöst, sodass noch vorhandene Erythrozyten

zerstört wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15ml PBS gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation bei 300g für 8min bei 4°C.

Nach Abschluss der Zentrifugation und Abgießen des Überstandes wurde das erhaltene Pellet in Nährmedium [1640 RPMI (1640 RPMI, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 1% Hepes Puffer (Hepes Buffer, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (1000 Units Penicillin und 10mg Streptomycin pro ml in 0,9% NaCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2% Glutamin (L-Glutamine 200mM, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,1% Amphotericin B (Amphotericin B 50mg, Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, gelöst in 50ml aqua dest., Bristol-Meyers-Squibb, New York City, USA) und 10% FCS (Fetal Bovine Serum Standard Quality, PAA, Pasching, Österreich)] gelöst. Die Zellzahl wurde anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Durch Zugabe von Trypanblau (Trypan Blue Solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) konnte die Zahl der toten Zellen bestimmt werden. Dann wurden 100000 vitale Zellen in sterilen 75cm<sup>2</sup> Corning-Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte erstmals ein Wechsel des Nährmediums.

## **2.4 Zellkultivierung**

Sobald die Fibroblasten in Kultur eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert. Dies war durchschnittlich alle zehn bis vierzehn Tage nötig. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt, verworfen und der Zellrasen mit 5ml PBS gewaschen. Nach Abgießen des PBS wurden die Fibroblasten mit 5ml einer Trypsin/EDTA Lösung (Trypsin EDTA solution 10x, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; verdünnt 1:10 in PBS) für 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde unter dem Auflichtmikroskop kontrolliert. Um die proteolytische Wirkung des Trypsins abzustoppen, wurden anschließend 5ml Nährmedium zugegeben, die Zellsuspension in ein 50ml Falcon-Tube überführt und bei 300g 10min zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in Nährmedium resuspendiert und auf Kulturflaschen verteilt.

## **2.5 Kryokonservierung und Auftauen von Fibroblasten**

Überzählige Fibroblasten wurden in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Dazu wurden die Zellpellets (etwa 1.000.000 Zellen) in 1ml Einfriermedium (10% DMSO

(Dimethylsulphoxide, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 40% FCS und 50% RPMI Medium) resuspendiert und langsam eingefroren (1./2. Tag: -80°C, 3.Tag: flüssiger Stickstoff bei -196°C).

Vor erneuter Verwendung wurden die gefrorenen Fibroblasten zügig bei Raumtemperatur aufgetaut, in 13ml Nährmedium gelöst und bei 300g für 10min zentrifugiert. Die weitere Vorgehensweise war analog zur Zellkultivierung (siehe oben).

## **2.6 Stimulation der Fibroblasten**

### **2.6.1 Vorbereitung der Substanzen zur Stimulation**

Sämtliche für die Stimulation benötigten Reagenzien wurden nach Herstellerangaben wie unten beschrieben gelöst. Als Lösungsmittel dienten dabei entweder PBS, DMSO, Ethanol (Ethanol, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder PBS mit 1% BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Falls bei den jeweiligen nachfolgend aufgelisteten Substanzen nicht anders vermerkt, hatten die entstandenen Stammlösungen eine Konzentration von 10mM. Verwendet wurden:

- *CL 316243 dissodium salt* ( $\beta_3$ -Agonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in PBS
- *Clonidine hydrochloride* ( $\alpha_2$ -Agonist), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in DMSO
- *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone* (DHT, siehe Einleitung), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in Ethanol
- *DPN* (ER- $\beta$ -Agonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in DMSO
- *17- $\beta$ -Estradiol* (E2, siehe Einleitung), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in DMSO
- *G1* (GPR30-Agonist), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in DMSO
- *G15* (GPR30-Antagonist), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in DMSO
- *ICI 182,780* (Östrogenrezeptorantagonist), BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland, gelöst in DMSO
- *IFN- $\gamma$*  (siehe Einleitung), PEPRO Tech, Rocky Hill NY, USA, gelöst in PBS mit 1% BSA, Endkonzentration 100 $\mu$ g/ml
- *IL-10* (siehe Einleitung), PromoKine, Heidelberg, Deutschland, gelöst in 1/10 aqua dest. und 9/10 PBS, Endkonzentration 10 $\mu$ g/ml

- *Isoproterenol hydrochloride* ( $\beta$ -Agonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in PBS, Endkonzentration 1mM
- *L-748,337* ( $\beta_3$ -Antagonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in DMSO
- *Nadolol* ( $\beta$ -Antagonist), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in DMSO
- *Nilutamide* (Androgen-Rezeptor Antagonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in DMSO
- *(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride* ( $\alpha_1$ -Agonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in PBS
- *Poly(I:C)* (TLR3-Rezeptor-Agonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in PBS, Endkonzentration 1 $\mu$ g/ml
- *PPT* (ER- $\alpha$ -Agonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in DMSO
- *Prazosine hydrochloride* ( $\alpha_1$ -Antagonist), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in DMSO
- *Resiniferatoxin* (Vanilloidrezeptoragonist), Tocris Bioscience, Bristol, UK, gelöst in DMSO, Endkonzentration 1mM
- *Yohimbine hydrochloride* ( $\alpha_2$ -Antagonist), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, gelöst in DMSO

Die Substanzen wurden gelöst, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.6.2 Vorbereitung der Zellen und Stimulation

Für Stimulationsversuche wurden Fibroblasten in 96-Well Platten überführt (10.000 Zellen pro Well). Vor der Stimulation wurde das Medium durch 180 $\mu$ l serumreduziertes Medium (2% FCS) ersetzt. Anschließend wurden in jede Vertiefung 40 $\mu$ l der jeweiligen Stimulussubstanz in der gewünschten Konzentration zugegeben. Danach wurden die Platten bei 37°C für 48 bzw. 72 Stunden inkubiert. Überstände wurden sofort für *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)-Tests verwendet oder bei -20°C eingefroren.

### 2.7 Messung

Die BAFF-Sekretion wurde bei einigen Versuchen mit einem kommerziellen ELISA-Kit gemessen. Die übrigen Analysen erfolgten mittels eines selbst gecoateten ELISA. Welcher ELISA zur Messung des sezernierten BAFF verwendet wurde, ist bei den einzelnen Versuchen im Ergebnisteil mit aufgeführt.

### **2.7.1 BAFF ELISA (kommerziell)**

Als kommerzielles ELISA-Kit wurde der „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA) verwendet. Die Durchführung zur Bestimmung der BAFF-Konzentration in den Proben erfolgte gemäß der Herstelleranleitung mit den im Kit enthaltenen Reagenzien.

### **2.7.2 BAFF ELISA (selbst gecoatet)**

Die BAFF-Konzentrationen in den Proben der restlichen Versuche wurden mit einem selbst gecoateten ELISA bestimmt.

96-Well Platten wurden dazu mit 100 µl/Well anti-BAFF polyclonal antibody (1 µg/ml, anti-hBAFF/BLyS Affinity Purified Goat IgG, R&D, Minneapolis, USA) über Nacht bei 4°C beschichtet. Anschließend wurden 100 µl Blocklösung (1% BSA in PBS) für 1h bei Raumtemperatur zugegeben. Nach einmaligem Waschen (Waschpuffer: PBS mit 0,05% Tween (Tween®, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)) wurden 100 µl Probe oder Standard (human BAFF/BLyS standard, R&D, Minneapolis, USA) je Well zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde drei Mal gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Detektionsantikörper (50 ng/ml, anti-hBAFF/BLyS detection antibody, R&D, Minneapolis, USA) für zwei Stunden. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 µl Streptavidin Poly-HRP-Lösung (50 ng/ml, Pierce Streptavidin Poly-HRP, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) für 30 min zugegeben. Nach weiteren drei Waschschritten wurden 100 µl Ultra-TMB (1-Step™ Ultra TMB-ELISA, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pro Well für ca. 10 Minuten als Entwicklerlösung hinzugefügt. Die so induzierte Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Merck, Darmstadt, Deutschland) abgestoppt. Die Messung der Absorption erfolgte anschließend mittels eines ELISA-Readers bei 450 nm.

### **2.7.3 IL-6 ELISA (kommerziell)**

IL-6 in Zellkulturüberständen wurde durch das Human IL-6 ELISA-Set (Duo Set, BD Biosciences, San Jose, USA) detektiert. Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Zudem waren wie im Set angegeben folgende weitere Reagenzien nötig: Coating Puffer (1 Tablette Carbonate-Bicarbonate Buffer capsule, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), PBS (Phosphate buffered saline tablet, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 0,05% Tween (Tween®, AppliChem, Darmstadt,

Deutschland), TMB-Tabletten (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine tablet, 1mg substrate per tablet, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Phosphat-Citrat-Puffer (Phosphate-Citrate Buffer tablet, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), PBS (Phosphate buffered saline tablet, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit 10% FCS (Fetal Bovine Serum Standard Quality, PAA, Pasching, Österreich) und 1M Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Lösung sämtlicher Substanzen erfolgte nach Angaben der jeweiligen Hersteller.

## **2.8 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Dabei wurden beim Vergleich zweier Gruppen der Mann-Whitney-U Test und beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen eine Varianzanalyse (ANOVA) mit post-hoc Test (Bonferroni) verwendet. Die Graphen wurden mit SigmaPlot Version 11.0 (SystatSoftware Inc., San Jose, USA) erstellt. Zum einen sind die erhaltenen Werte in Form von vertikalen Streudiagrammen dargestellt, wobei jeder dargestellte Punkt dem Messergebnis eines Patienten entspricht. Doppelt auftretende Werte sind nur einfach dargestellt. Zusätzlich sind vertikale Box Whisker Plots eingezeichnet. „Die untere Grenze der Box zeigt das 25. Perzentil, eine Linie innerhalb der Box markiert den Median und die obere Grenze der Box am weitesten von Null zeigt das 75. Perzentil. Linien (Whiskers) oberhalb und unterhalb der Box geben das 90. bzw. 10. Perzentil an. [...] Es werden zumindest drei Punkte für die Berechnung des 25. bzw. 75. Perzentils und zumindest neun Punkte für das 5., 10., 90. und 95. Perzentil benötigt“ (142). Sind in einem Diagramm keine entsprechenden Linien eingezeichnet, reicht folglich die Zahl der Messwerte nicht für die Berechnung derselben aus.

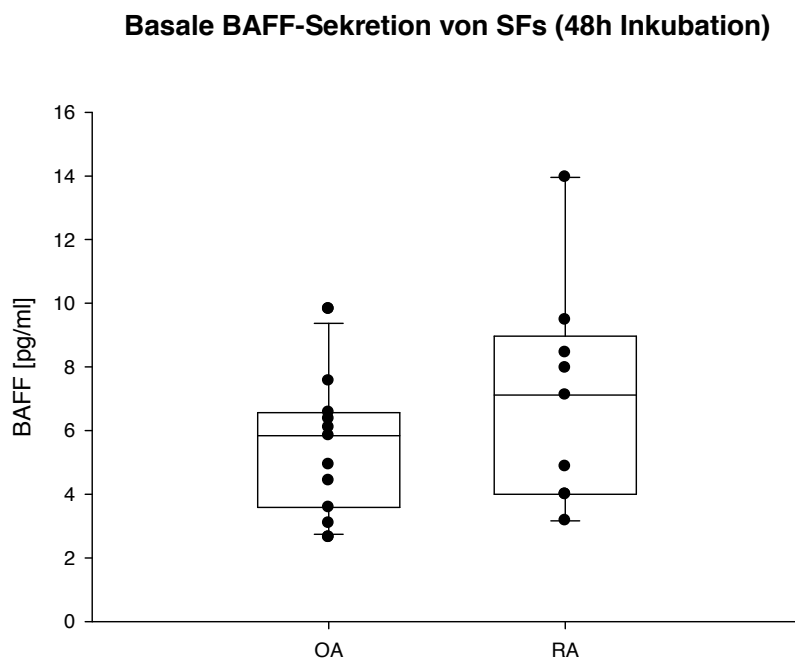


### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Basale BAFF-Sekretion von SFs

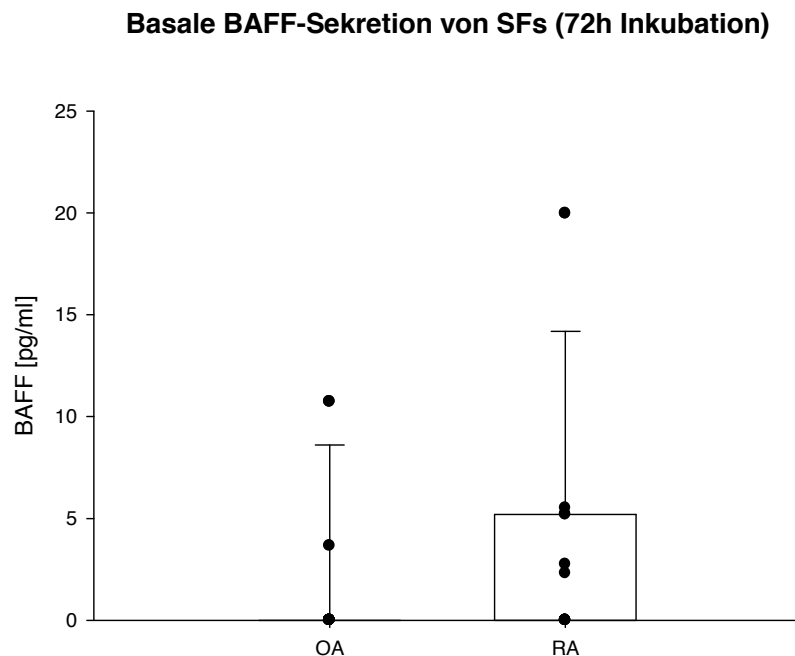
Um zu untersuchen, ob SFs basal BAFF sezernieren, wurden OASFs und RASFs für 48 bzw. 72 Stunden mit Medium ohne weitere Zusätze inkubiert.

Nach 48 Stunden konnte sowohl bei OASFs als auch bei RASFs BAFF im Überstand detektiert werden, wobei sich zwischen den beiden Gruppen im Vergleich mittels Mann-Whitney-U Test kein Unterschied in der Höhe des sezernierten BAFF ergab (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1:** Basale BAFF-Sekretion von SFs (n=11 bei OASFs und n=9 bei RASFs). Die Fibroblasten wurden über 48h mit Nährmedium ohne Stimulussubstanzen inkubiert und im Anschluss mittels ELISA im Überstand das sezernierte BAFF gemessen. BAFF in pg/ml wird auf der y-Achse dargestellt, die Art der Fibroblasten (OASFs bzw. RASFs) auf der x-Achse. Jeder Punkt der Grafik entspricht dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach dargestellt werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

Auch nach Inkubation über 72h zeigte sich eine basale BAFF-Sekretion ohne Unterschied zwischen OASFs und RASFs. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test (Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2:** Basale BAFF-Sekretion von SFs (n=12 bei OASFs und n=13 bei RASFs). Die Fibroblasten wurden über 72h mit Nährmedium ohne Stimulussubstanzen inkubiert und im Anschluss mittels ELISA im Überstand das sezernierte BAFF gemessen. BAFF in pg/ml ist auf der y-Achse dargestellt, die Art der Fibroblasten (OASFs bzw. RASFs) auf der x-Achse. Jeder Punkt der Grafik entspricht dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach dargestellt werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der Werte, der Median der Ergebnisse ist als durchgängiger Strich eingezeichnet. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

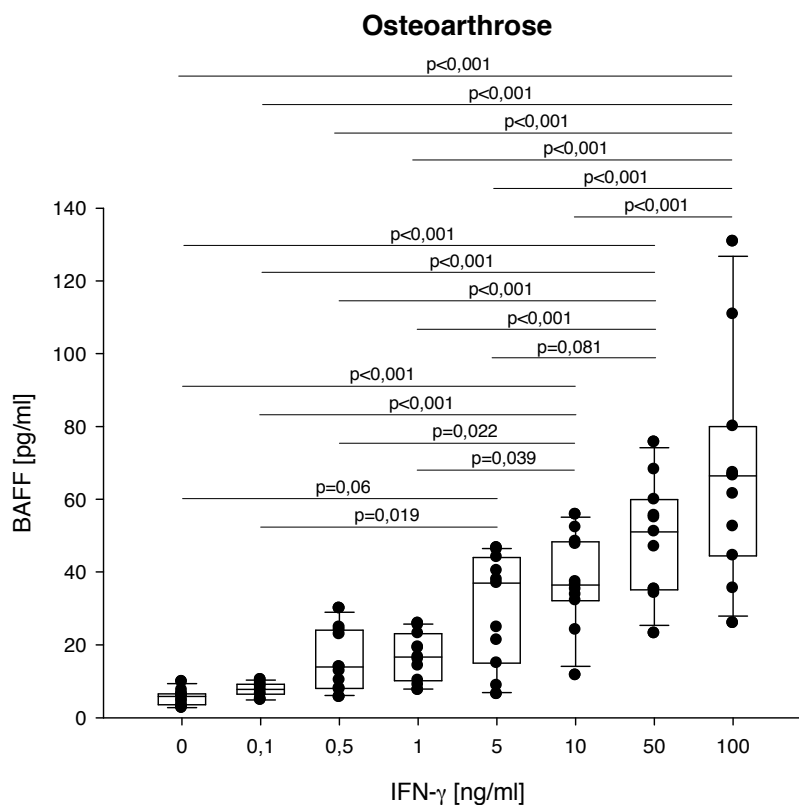
Die Messung der BAFF-Sekretion nach 48h erfolgte mittels eines selbst gecoateten ELISA (siehe Material und Methoden), die der nach 72h mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA). Bei unterschiedlichen Messmethoden war somit ein Vergleich zwischen der Sekretion nach 48 und 72h nicht möglich.

Zusammenfassend sezernierten OASFs und RASFs sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden ohne Stimulation BAFF in geringer, aber gleicher Menge.

### 3.2 IFN- $\gamma$ als Induktor der BAFF-Sekretion bei SFs

Um den Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die BAFF-Sekretion von SFs genauer zu untersuchen, wurden SFs für 48 Stunden mit IFN- $\gamma$  in den Konzentrationen 0,1ng/ml, 0,5ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml und 100ng/ml inkubiert und in den Überständen mittels des selbst gecoateten ELISA die Höhe des sezernierten BAFF gemessen. Die BAFF-Werte bei den verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  wurden mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur untereinander und mit denen der unstimulierten Kontrolle verglichen.

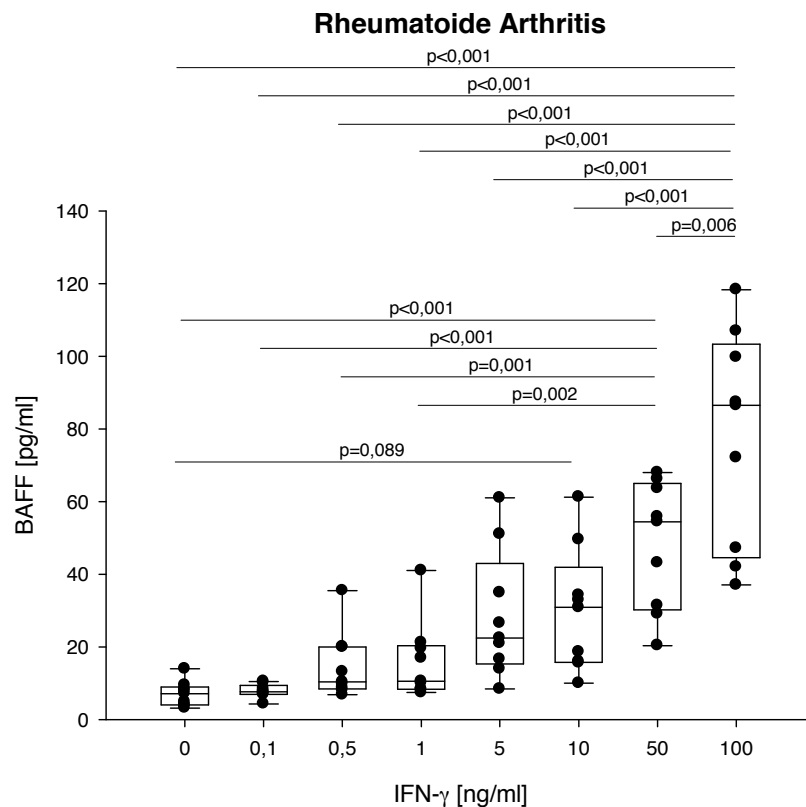
Bei OASFs zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der BAFF-Sekretion durch IFN- $\gamma$  (Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die BAFF-Sekretion bei OASFs (n=11), Stimulation über 48 Stunden. Die Konzentration von IFN- $\gamma$  als Stimulussubstanz wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die

zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als horizontale Balken mit eingezeichnetem p-Wert sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen dargestellt.

Bei RASFs zeigte sich ebenso eine konzentrationsabhängige Steigerung der BAFF-Sekretion durch IFN- $\gamma$  (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4:** Konzentrationsabhängiger Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die BAFF-Sekretion bei RASFs (n=9), Stimulation über 48 Stunden. Die Konzentration von IFN- $\gamma$  als Stimulussubstanz wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Als horizontale Balken mit eingezeichnetem p-Wert sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen eingezeichnet.

Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich für die einzelnen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  kein Unterschied in der BAFF-Sekretion zwischen OASFs und RASFs.

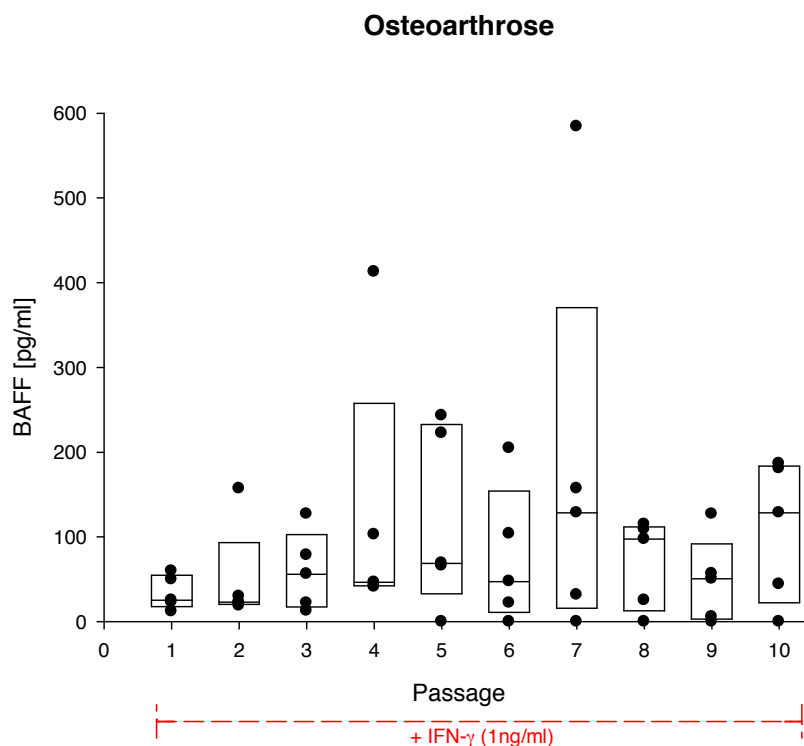
Zusammenfassend ergab sich eine konzentrationsabhängige Steigerung sowohl bei OASFs als auch bei RASFs. Ein Unterschied in der Menge des sezernierten BAFF zwischen beiden Versuchsgruppen fand sich nicht.

### 3.3 Einfluss der Zellpassage auf die BAFF-Sekretion von SFs

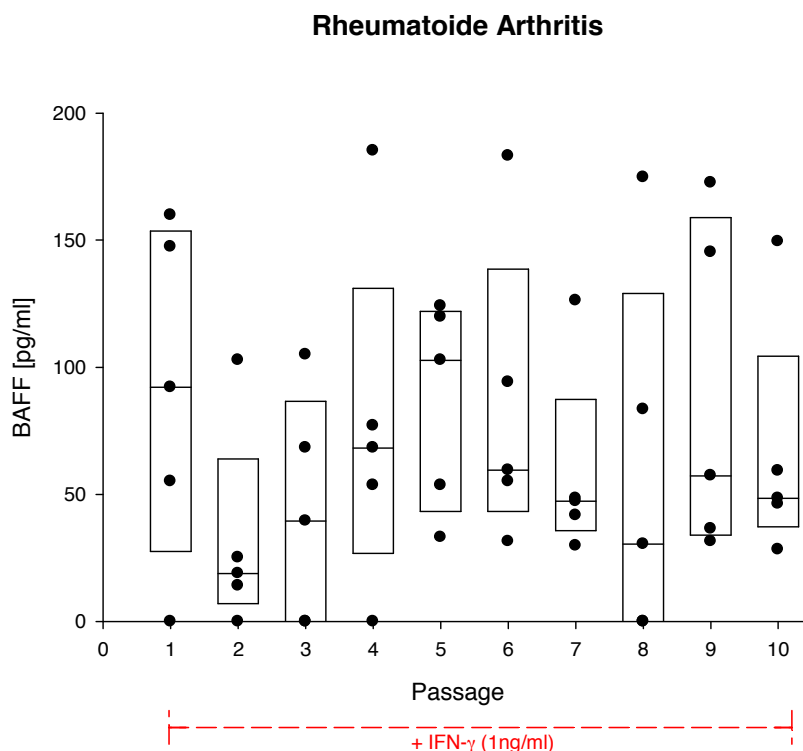
Um zu untersuchen, inwieweit Passagierung die Eigenschaften der SFs in Bezug auf die durch IFN- $\gamma$  induzierte BAFF-Sekretion verändert, wurden SFs von Passage 1 bis 10 mit IFN- $\gamma$  1ng/ml über 72 Stunden inkubiert. Zugleich wurden SFs als Kontrolle ohne Stimulation unter ansonsten gleichen Bedingungen untersucht.

Ohne Inkubation mit IFN- $\gamma$  war nach 72-stündiger Stimulation und Messung mit dem „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA) über alle Passagen sowohl bei OASFs als auch bei RASFs kein BAFF detektierbar. Eine spontane BAFF-Sekretion mit steigender Passagierung konnte nicht beobachtet werden.

Erst nach Inkubation mit 1ng/ml IFN- $\gamma$  wurde bei OASFs in 88% der Proben, bei RASFs in 86% BAFF induziert. Die Höhe des sezernierten BAFF war bei OASFs und RASFs gleich. Die Anzahl der Passagen hatte weder bei OASFs noch bei RASFs einen signifikanten Einfluss auf die Menge an sezerniertem BAFF (Abb. 3.5 und 3.6).



**Abbildung 3.5:** Einfluss der Zellpassage auf die BAFF-Sekretion von OASFs nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), Stimulation über 72 Stunden, n=5. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Passage wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF in pg/ml auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist.



**Abbildung 3.6:** Einfluss der Zellpassage auf die BAFF-Sekretion von RASFs, Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) über 72 Stunden, n=5. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Passage wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF in pg/ml auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist.

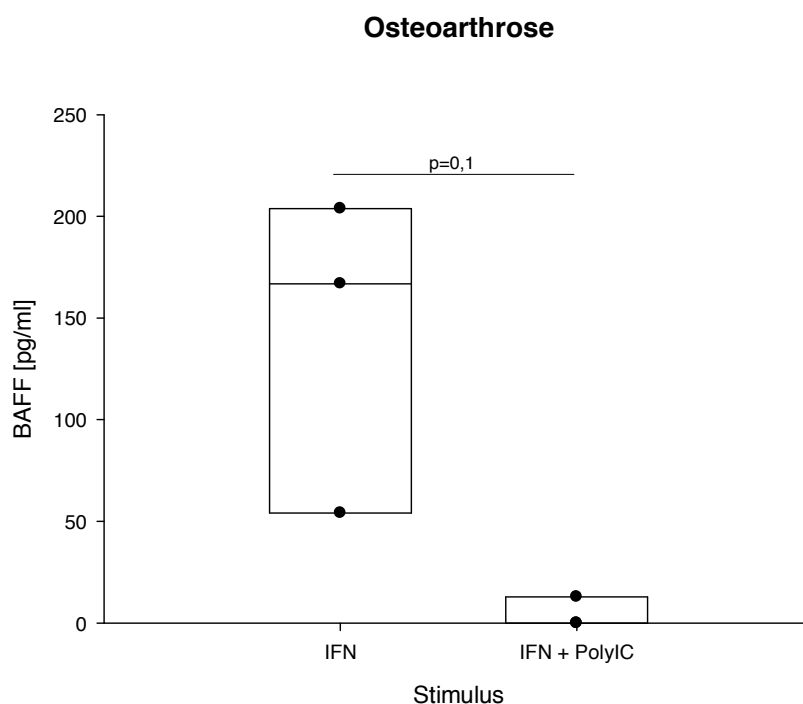
Es konnte folglich gezeigt werden, dass Passagierung weder Einfluss auf die basale noch auf die durch IFN- $\gamma$  induzierte BAFF-Sekretion bei SFs hat.

### 3.4 Einfluss von Poly(I:C) auf die BAFF-Sekretion von SFs

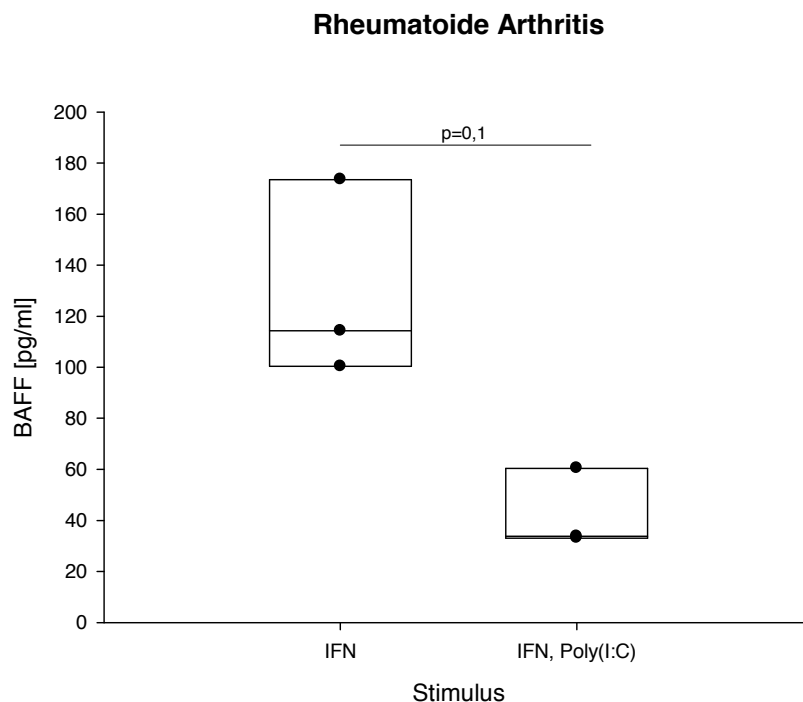
In diesem Versuchsteil wurde am Beispiel des TLR-3 Agonisten Poly(I:C) untersucht, welchen Einfluss Liganden des angeborenen Immunsystems auf die BAFF-Sekretion von SFs haben. Dazu wurden OASFs und RASFs über 72 Stunden mit Poly(I:C) (10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml bzw. 10ng/ml) inkubiert und in den Überständen mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA) das messbare BAFF detektiert.

Poly(I:C) alleine hatte bei OASFs keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion (stimuliert und unstimuliert war kein BAFF messbar). Bei RASFs lag der Mittelwert unstimuliert bei 5,9pg/ml (SD: 2,5), nach Inkubation mit Poly(I:C) bei 9pg/ml (SD: 8,1), wobei sich im Mann-Whitney-U Test kein Unterschied zwischen den Gruppen ergab (Daten nicht gezeigt). Die einzelnen Konzentrationen von Poly(I:C) (10µg/ml, 1µg/ml, 100ng/ml bzw. 10ng/ml) hatten ebenso keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion der RASFs (Berechnung mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur, Daten nicht gezeigt).

Weiterhin erfolgte die zeitgleiche Inkubation von SFs mit IFN-γ und Poly(I:C). Dabei reduzierte die Zugabe von Poly(I:C) (1µg/ml) und IFN-γ (10ng/ml) über 72 Stunden die BAFF-Sekretion sowohl bei OASFs als auch bei RASFs im Vergleich zur Stimulation mit IFN-γ (10ng/ml) alleine (Abb. 3.7 und 3.8).



**Abbildung 3.7:** Einfluss von Poly(I:C) (1µg/ml) auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN-γ (10ng/ml), n=3, Inkubation über 72 Stunden. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Signifikante Unterschiede sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.8:** Einfluss von Poly(I:C) (1µg/ml) auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN-γ (10ng/ml), n=3, Inkubation über 72 Stunden. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Poly(I:C) beeinflusste demnach die BAFF-Sekretion von SFs ohne zusätzlichen Stimulus nicht, bei zeitgleicher Inkubation mit IFN-γ konnte es die BAFF-Sekretion im



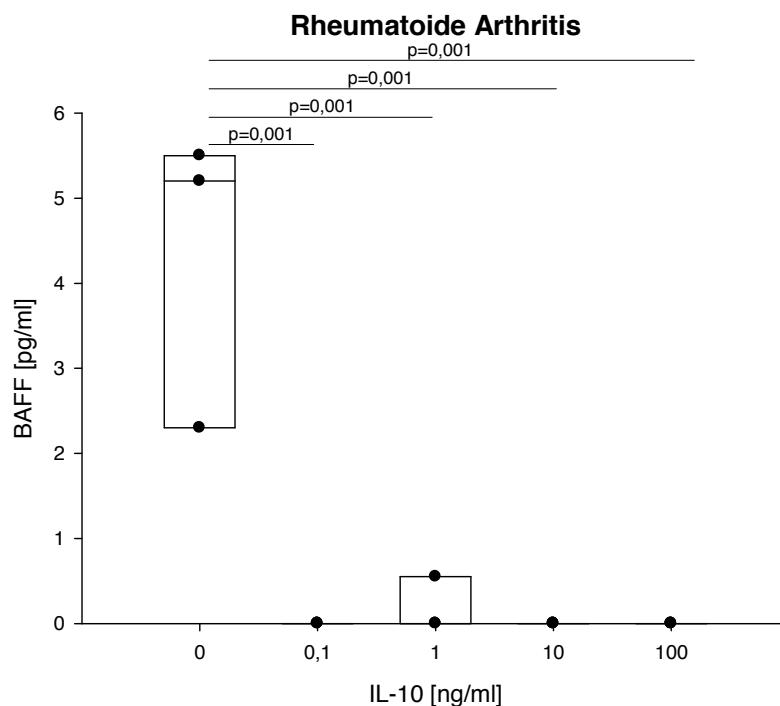
Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN- $\gamma$  jedoch sowohl bei RASFs als auch bei OASFs reduzieren.

### 3.5 Einfluss von IL-10 auf die BAFF-Sekretion von SFs

Inwieweit das Zytokin IL-10 die BAFF-Sekretion von SFs beeinflusst, wurde durch 72-stündige Stimulation von OASFs und RASFs (n=3 für jede Gruppe) mit IL-10 (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml bzw. 100ng/ml) untersucht. In den Überständen wurde mit Hilfe des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA) das detektierbare BAFF gemessen.

Bei OASFs (n=3) war sowohl mit als auch ohne Stimulation mit IL-10 kein BAFF in nachweisbarer Höhe im Überstand vorhanden (Daten nicht gezeigt).

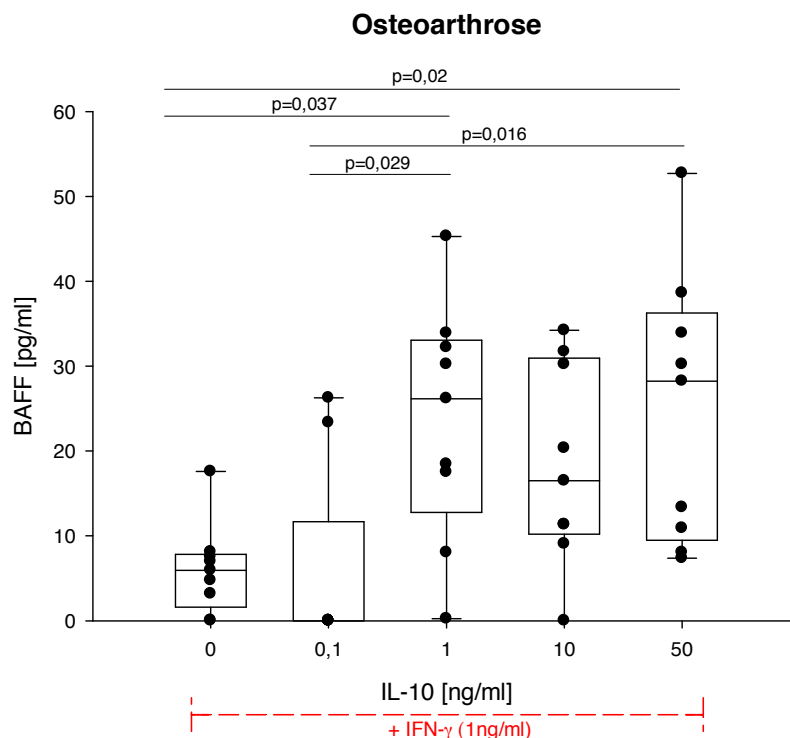
Bei RASFs verminderte jede der verwendeten IL-10 Konzentrationen (0,1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml bzw. 100ng/ml) die BAFF-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.9).



**Abbildung 3.9:** Einfluss von IL-10 auf die BAFF-Sekretion von RASFs, n=3, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnungen erfolgten mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Konzentration von IL-10 wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der

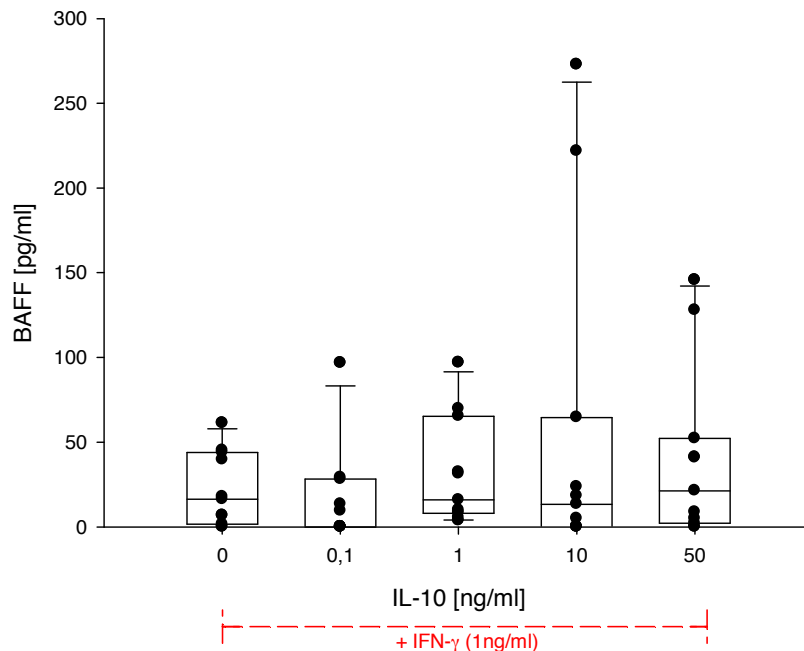
Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Weiterhin wurden SFs zeitgleich mit IL-10 und IFN- $\gamma$  (1ng/ml) über 72 Stunden inkubiert. Dabei zeigte sich bei OASFs eine Erhöhung der spontanen BAFF-Sekretion durch Stimulation mit IL-10 und IFN- $\gamma$  (1ng/ml) im Vergleich zur Stimulation mit IFN- $\gamma$  alleine (Abb. 3.10). Bei RASFs hatte IL-10 in Kombination mit IFN- $\gamma$  keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion im Vergleich zur Stimulation mit IFN- $\gamma$  alleine (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.10:** Einfluss von IL-10 auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=9, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

### Rheumatoide Arthritis



**Abbildung 3.11:** Einfluss von IL-10 auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

Die Stimulation mit IL-10 und IFN- $\gamma$  in der Konzentration 10ng/ml bewirkte keinen Unterschied in der BAFF-Sekretion im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle. Auch konzentrationsabhängige Unterschiede zeigten sich nicht (n=3, Daten nicht gezeigt).

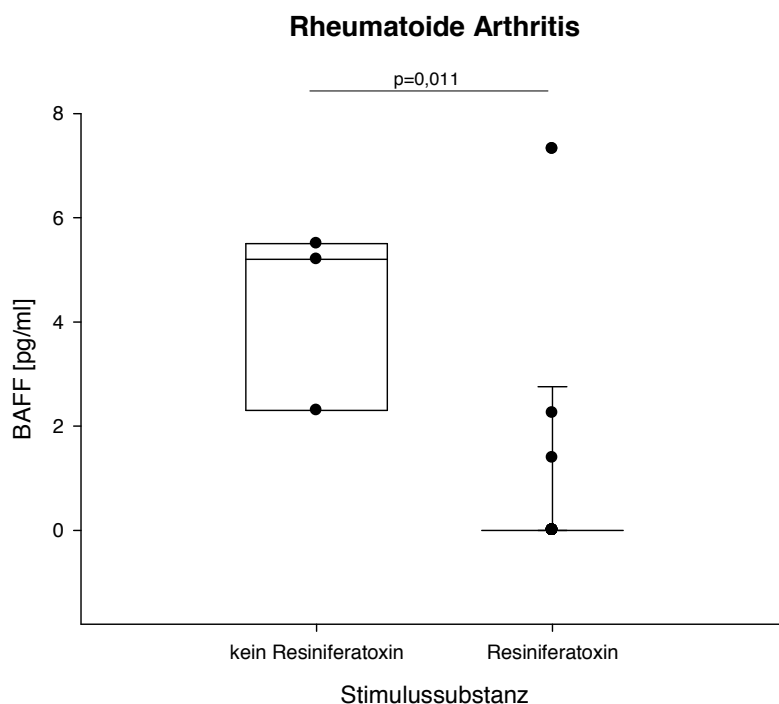
Zusammenfassend war bei alleiniger Stimulation von RASFs mit IL-10 eine Verminderung der spontanen BAFF-Sekretion feststellbar. Zeitgleiche Zugabe von IL-10 und IFN- $\gamma$  (1ng/ml) bewirkte bei OASFs eine Steigerung der BAFF-Sekretion im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle.

### 3.6 Einfluss von Resiniferatoxin auf die BAFF-Sekretion von SFs

Resiniferatoxin ist ein Agonist am Vanilloidrezeptor *transient receptor potential cation channel subfamily V 1* (TRPV1) und kann über Aktivierung von Kalziumkanälen die Zytokinproduktion von SFs beeinflussen (143, 144). Um zu untersuchen, ob es auf die BAFF-Sekretion von SFs Einfluss nehmen kann, wurden OASFs und RASFs (n=3 in jeder Gruppe) für 72 Stunden mit Resiniferatoxin in den Konzentrationen  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-10}$ M bzw.  $10^{-11}$ M inkubiert und in den Überständen mit Hilfe des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA) die BAFF-Konzentration detektiert.

Bei OASFs (n=3) war sowohl mit als auch ohne Stimulation mit Resiniferatoxin kein BAFF in nachweisbarer Höhe im Überstand vorhanden (Daten nicht gezeigt).

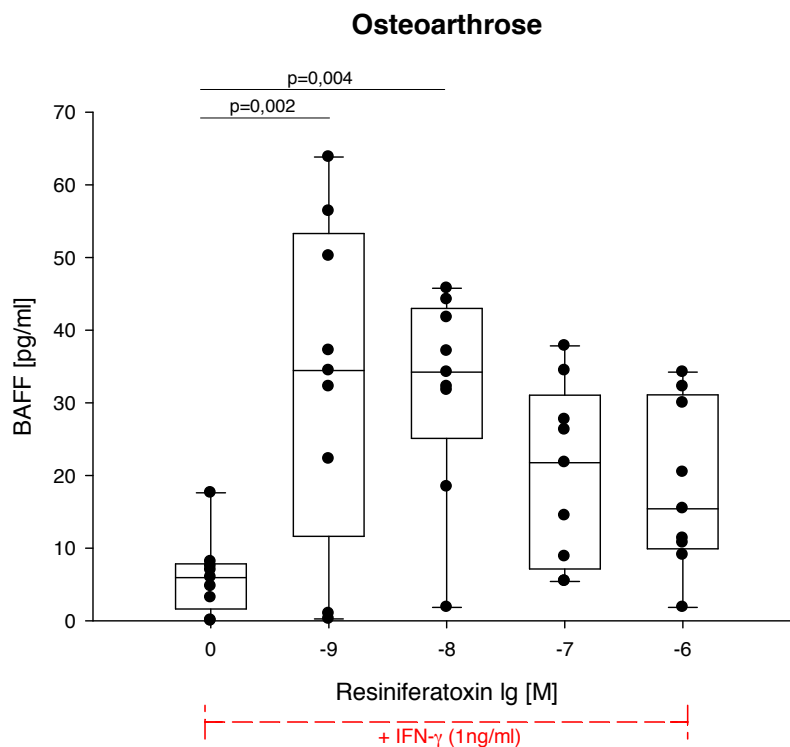
Bei RASFs zeigte sich eine Verminderung der BAFF-Sekretion nach Zugabe von Resiniferatoxin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.12). Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen von Resiniferatoxin fanden sich hingegen nicht (Berechnung mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur, Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.12:** Einfluss von Resiniferatoxin auf die BAFF-Sekretion von RASFs, n=3, Inkubation über 72 Stunden. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. Die Art der Stimulation (kein Resiniferatoxin vs. Resiniferatoxin) wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei

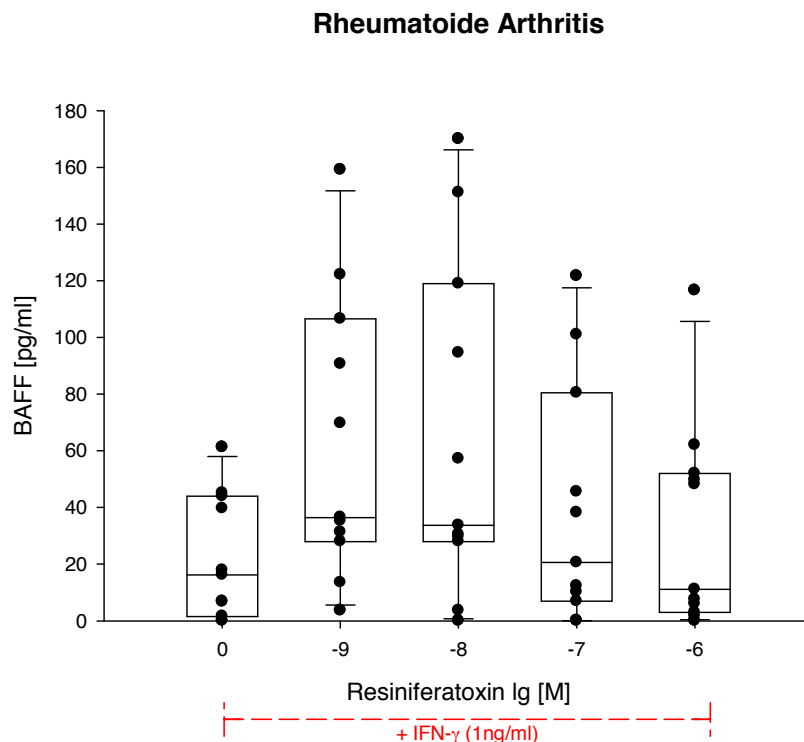
dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Bei zeitgleicher Inkubation von SFs mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) und Resiniferatoxin ergab sich bei OASFs eine Erhöhung der BAFF-Sekretion durch Resiniferatoxin im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle (Abb. 3.13). Bei RASFs hatte Resiniferatoxin dagegen keinen derartigen Effekt (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.13:** Einfluss von Resiniferatoxin auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=9, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die

zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.14:** Einfluss von Resiniferatoxin auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Bei zeitgleicher Inkubation von SFs mit Resiniferatoxin und IFN- $\gamma$  (10ng/ml) war dagegen kein Einfluss von Resiniferatoxin auf die BAFF-Sekretion zu erkennen (n=3, Daten nicht gezeigt).

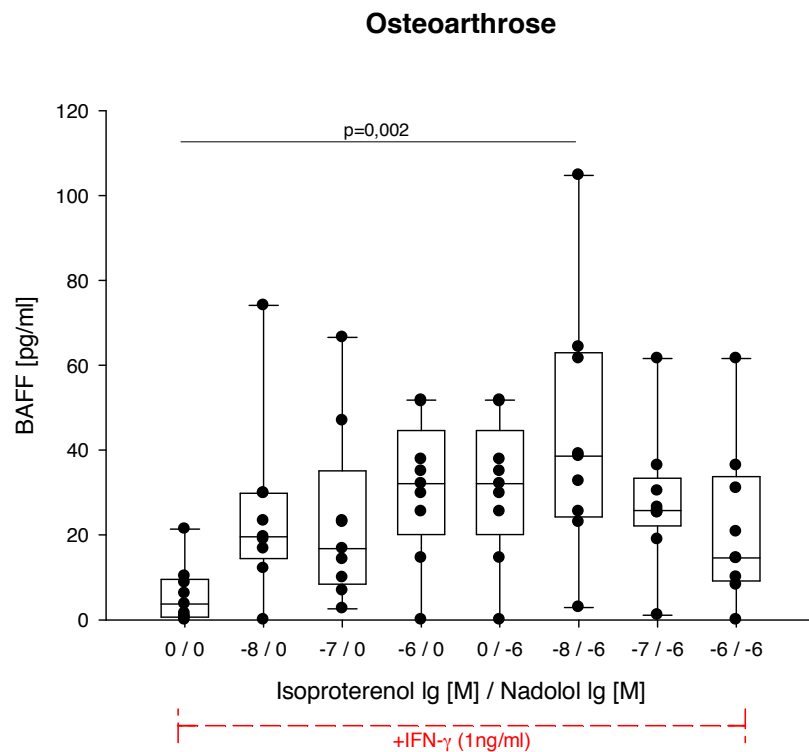
Zusammenfassend zeigte sich, dass Resiniferatoxin bei RASFs die spontane BAFF-Sekretion vermindert. Zeitgleiche Stimulation der SFs mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) bewirkte bei OASFs eine Zunahme des sezernierten BAFF.

### **3.7 Einfluss von Adrenozeptoragonisten und -antagonisten auf die BAFF-Sekretion von SFs**

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, spielen Adrenozeptoren und ihre Liganden eine wichtige Rolle bei der RA. Der Zusammenhang zwischen BAFF-Sekretion und Adrenozeptoragonisten und -antagonisten bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. SFs wurden dazu für 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  und Adrenozeptoragonisten bzw. -antagonisten in verschiedenen Konzentrationen stimuliert: Isoproterenol ( $\beta$ -Agonist), Nadolol ( $\beta$ -Antagonist), Nadolol in Kombination mit Isoproterenol, CL 316243 ( $\beta_3$ -Agonist), L-748,337 ( $\beta_3$ -Antagonist), L-748,337 in Kombination mit CL 316243, Phenylephrine ( $\alpha_1$ -Agonist), Prazosine ( $\alpha_1$ -Antagonist), Prazosine in Kombination mit Phenylephrine, Clonidine ( $\alpha_2$ -Agonist), Yohimbine ( $\alpha_2$ -Antagonist) und Yohimbine in Kombination mit Clonidine. Die Messung des sezernierten BAFF in den Überständen erfolgte mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA).

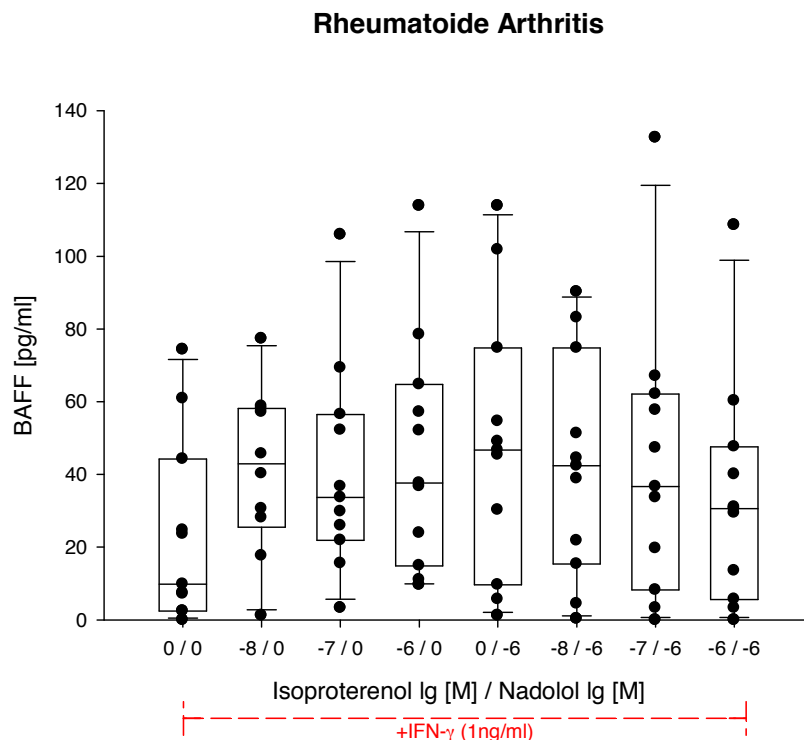
Dabei fand sich einzig bei OASFs bei der Kombination aus Isoproterenol  $10^{-8}$ M mit Nadolol  $10^{-6}$ M und IFN- $\gamma$  (1ng/ml) eine Steigerung der BAFF-Sekretion im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) stimulierten Kontrolle (Abb. 3.15). Bei RASFs hatten Isoproterenol und Nadolol keinen Einfluss (Abb. 3.16).

Alle weiteren genannten Substanzen hatten keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.15:** Einfluss von Isoproterenol und/oder Nadolol auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml),  $n=9$ , Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.





**Abbildung 3.16:** Einfluss von Isoproterenol und/oder Nadolol auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

Adrenozeptoragonisten und -antagonisten hatten demnach im gezeigten Versuchsaufbau praktisch keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion von SFs.

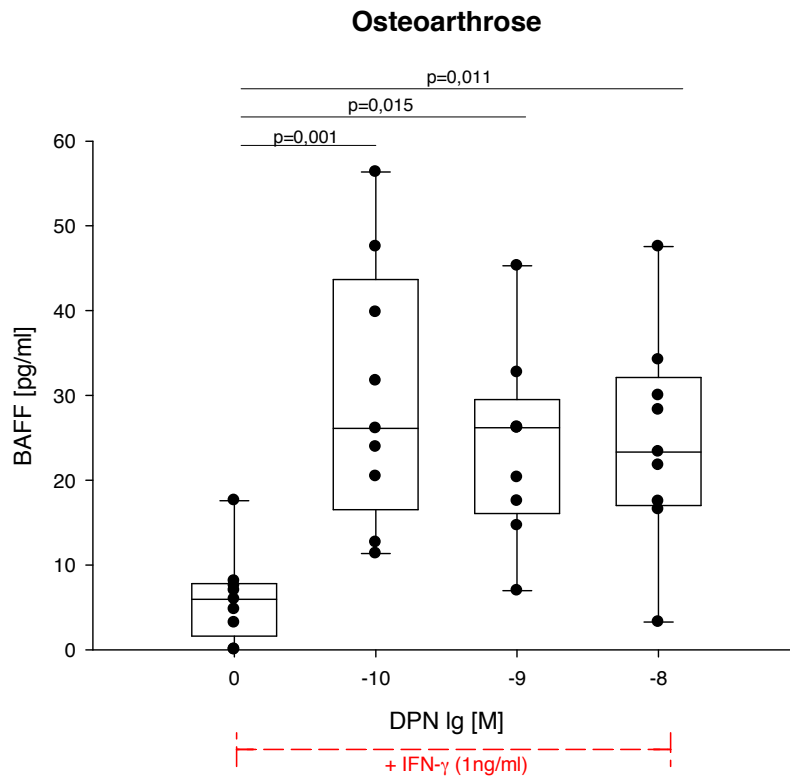
### 3.8 Einfluss von Sexualhormonen auf die BAFF-Sekretion von SFs

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, haben Sexualhormone einen wichtigen Stellenwert in der Pathogenese und Chronifizierung entzündlicher Erkrankungen wie der RA (120). Aus diesem Grund wurden SFs in der vorliegenden Arbeit mit Agonisten verschiedener Sexualhormonrezeptoren und deren Antagonisten inkubiert.

#### 3.8.1 DPN

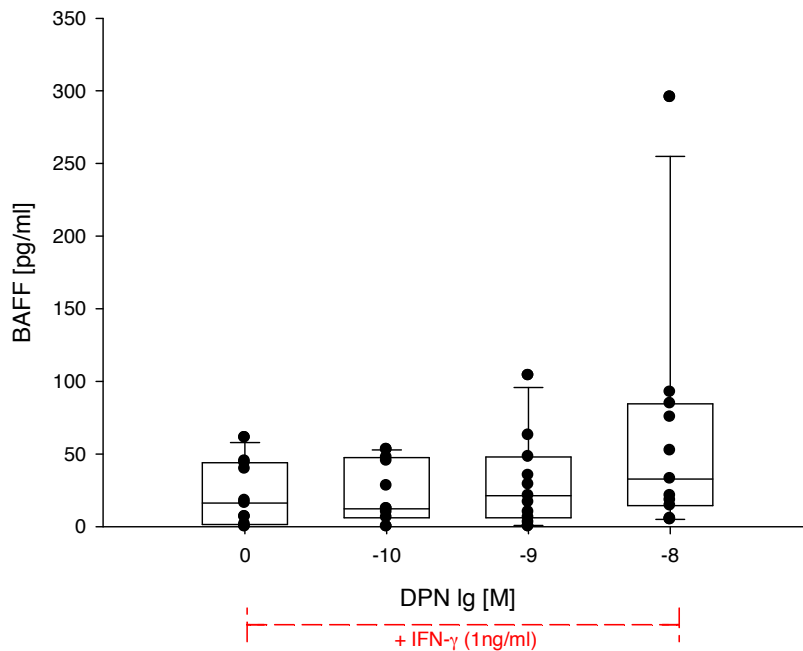
Die Zugabe des ER- $\beta$  Agonisten DPN in den Konzentrationen  $10^{-10}$ M,  $10^{-9}$ M bzw.  $10^{-8}$ M zu zeitgleich mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) stimulierten SFs bewirkte bei OASFs nach 72-

stündiger Stimulation eine Erhöhung der BAFF-Sekretion bei jeder Konzentration von DPN im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle (Abb. 3.17). Bei RASFs hatte DPN keinen Effekt (Abb. 3.18). Die Messung des sezernierten BAFF erfolgte mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA).



**Abbildung 3.17:** Einfluss von DPN auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=9, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

## Rheumatoide Arthritis



**Abbildung 3.18:** Einfluss von DPN auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

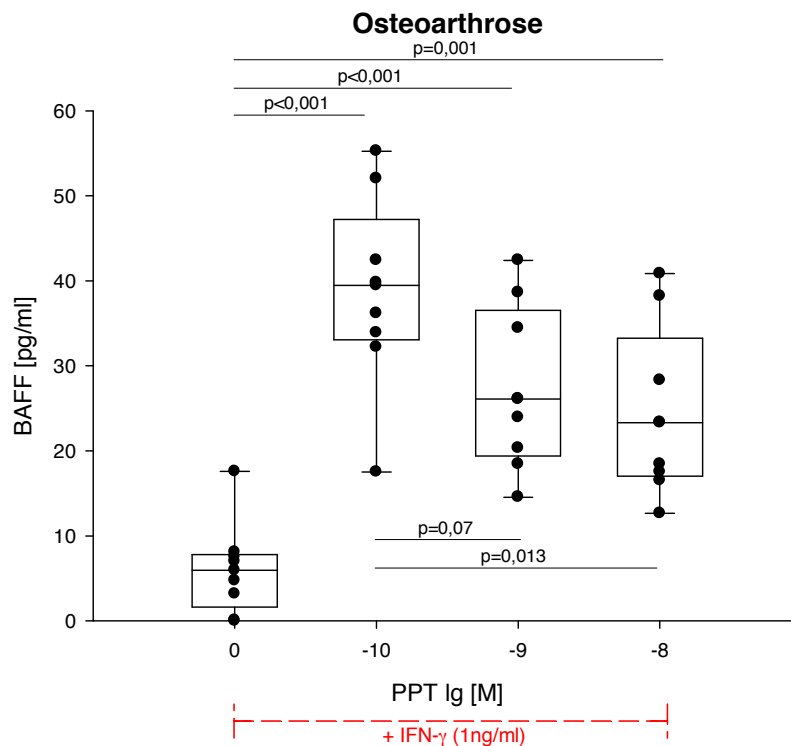
Bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml) hatte DPN keinen Effekt auf die BAFF-Sekretion (n=3, Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend bewirkte DPN bei OASFs eine Erhöhung der BAFF-Sekretion bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml). Hingegen waren bei RASFs keine Effekte zu beobachten.

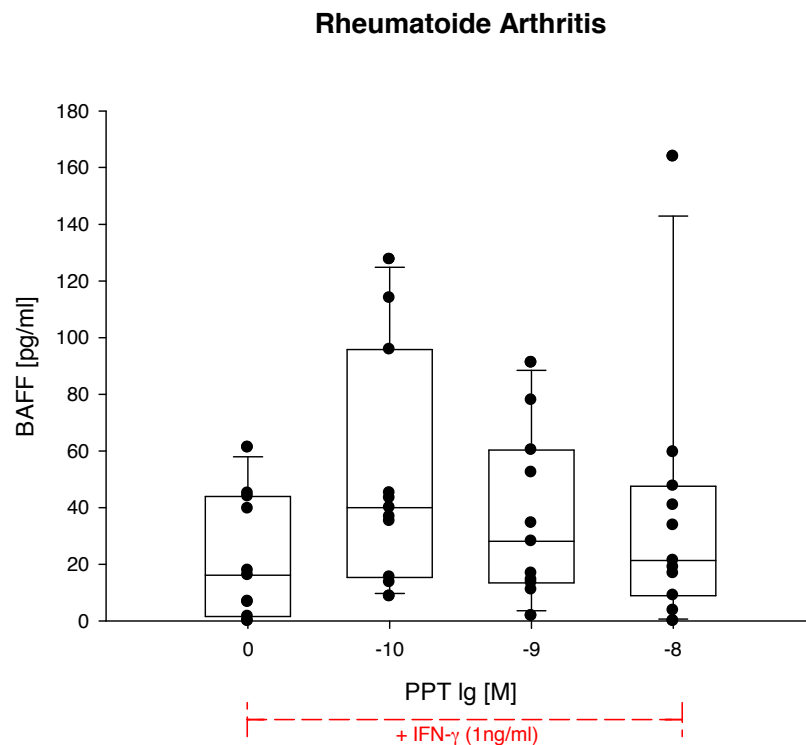
### 3.8.2 PPT

Bei zeitgleicher Inkubation von SFs für 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) und dem ER- $\alpha$  Agonisten PPT hatte bei OASFs jede der verwendeten Konzentrationen von PPT einen Einfluss auf die BAFF-Sekretion. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der

gemessenen BAFF-Spiegel nach Zugabe von PPT im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, wobei die BAFF-Werte mit zunehmender PPT-Konzentration wieder abfielen, jedoch noch immer über denen der unstimulierten Kontrolle lagen (Abb. 3.19). Bei RASFs hatte die Zugabe von PPT keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion (Abb. 3.20). Die Messung des sezernierten BAFF erfolgte mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA).



**Abbildung 3.19:** Einfluss von PPT auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=9, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.20:** Einfluss von PPT auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Bei zeitgleicher Stimulation von SFs mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml) hatte PPT keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion (n=3, Daten nicht gezeigt).

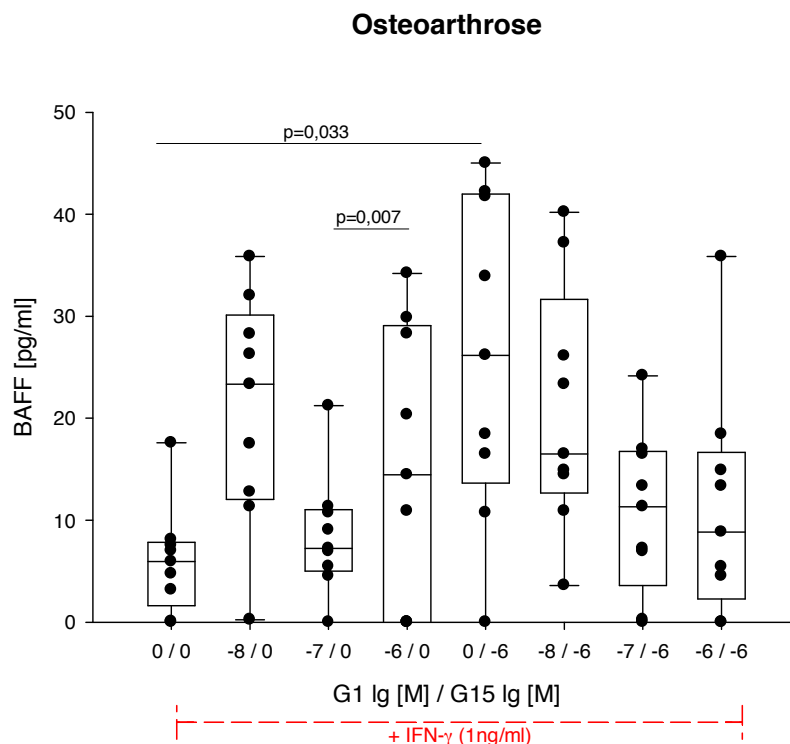
Zusammenfassend bewirkte PPT bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) eine Steigerung der BAFF-Sekretion im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) stimulierten Kontrolle.

### 3.8.3 G1 und/oder G15

Wie in der Einleitung bereits erläutert wurde, können Östrogene nicht nur über die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ , sondern auch über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

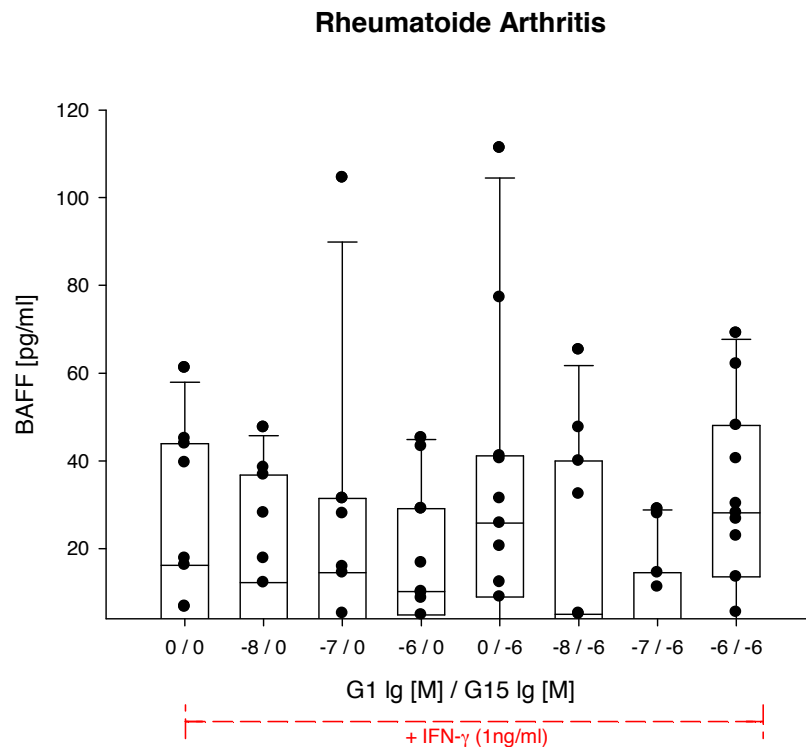
wirken (115–119). Inwieweit dieser Weg der Signaltransduktion auf die BAFF-Sekretion von SFs relevant ist, wurde durch 72-stündige Stimulation von OASFs und RASFs mit G1 und/oder G15 untersucht. G1 wirkt gemäß Herstellerangaben als Agonist am G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptor, G15 als Antagonist. Die Messung des sezernierten BAFF erfolgte mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA).

Bei OASFs erhöhte G15 in Höhe von  $10^{-6}$ M mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) die BAFF-Sekretion im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle. Weiterhin war bei G1 ( $10^{-6}$ M) mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) der BAFF-Spiegel höher als bei G1 ( $10^{-7}$ M) mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml). Bei RASFs hatten G1 bzw. G15 keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.21 und Abb. 3.22 dargestellt.



**Abbildung 3.21:** Einfluss von G1 und/oder G15 auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=9, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die

zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.22:** Einfluss von G1 und/oder G15 auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

Bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml) war kein Einfluss von G1 und/oder G15 auf die BAFF-Sekretion feststellbar (n=3, Daten nicht gezeigt).

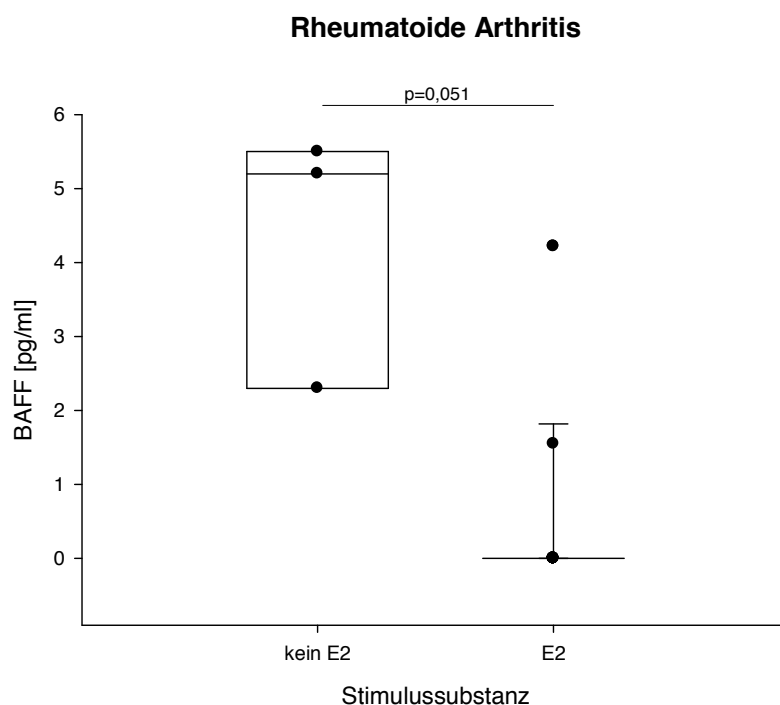
Der einzige deutliche Effekt war demnach die Steigerung der BAFF-Sekretion bei OASFs nach Zugabe des Rezeptorantagonisten G15 im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle. G1 hatte keine Auswirkungen auf die BAFF-Sekretion von SFs.

### 3.8.4 E2 und/oder ICI

Um nicht nur die Effekte der einzelnen Östrogenrezeptorsubtypen auf die BAFF-Sekretion von SFs zu untersuchen, sondern die Effekte der Rezeptoren im Zusammenspiel zu beobachten, wurden OASFs und RASFs mit E2 und/oder dessen Antagonist ICI stimuliert. Die Messung des sezernierten BAFF im Überstand erfolgte mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA).

RASFs, die für 72 Stunden mit E2 in Höhe von  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-11}\text{M}$  bzw.  $10^{-12}\text{M}$  inkubiert wurden, produzierten mit statistischem Trend weniger BAFF als unstimulierte Kontrollen (Abb. 3.23).

Bei OASFs (n=3) war sowohl mit als auch ohne Stimulation mit E2 kein BAFF in nachweisbarer Höhe im Überstand vorhanden.

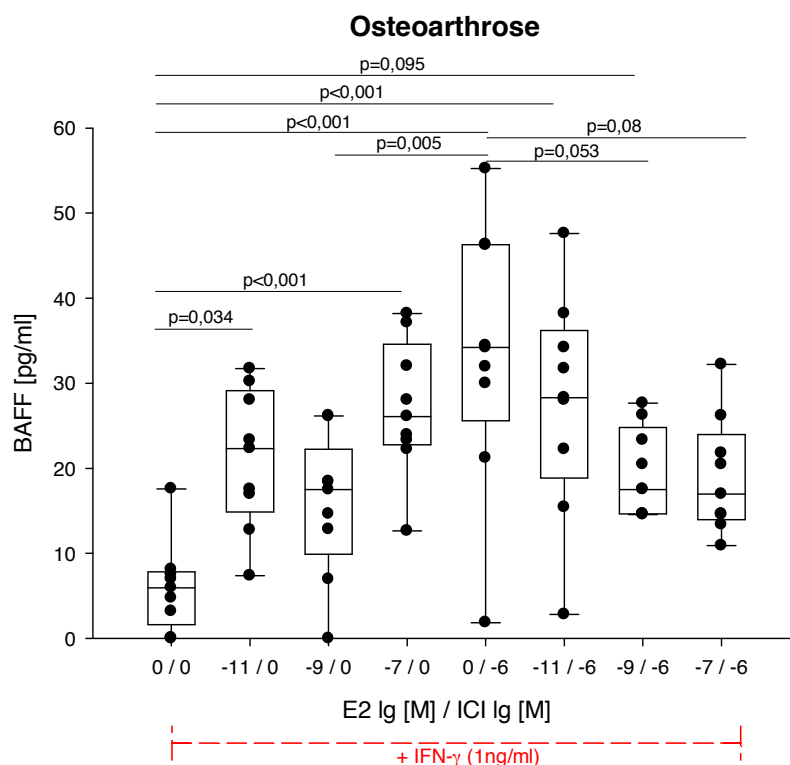


**Abbildung 3.23:** Einfluss von E2 auf die BAFF-Sekretion von RASFs, n=3, Inkubation über 72 Stunden. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. Die Art der Stimulation (kein E2 vs. E2) wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken



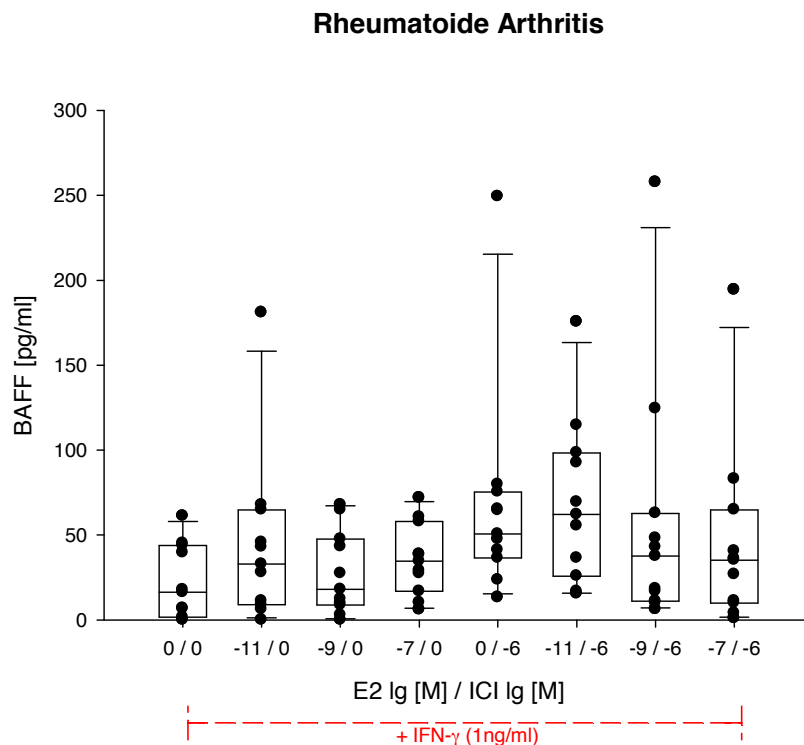
repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Außerdem wurden SFs zeitgleich mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) und E2 und/oder ICI inkubiert. Wiederum erfolgte die Messung des sezernierten BAFF im Überstand mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA). Bei OASFs erhöhte die alleinige Zugabe sowohl von E2 als auch von ICI die messbare BAFF-Sekretion im Vergleich zur Stimulation mit nur IFN- $\gamma$ . Die Erhöhung des sezernierten BAFF durch ICI wurde bei Zugabe von E2 zusätzlich zu ICI wieder vermindert (Abb. 3.24). Bei RASFs hingegen hatten E2 und/oder ICI keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion (Abb. 3.25).



**Abbildung 3.24:** Einfluss von E2 und/oder ICI auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Zugabe von IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=9, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die

zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.25:** Einfluss von E2 und/oder ICI auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Zugabe von IFN- $\gamma$  (1 ng/ml), n=11, Inkubation über 72 Stunden. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Bei Inkubation mit IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) statt IFN- $\gamma$  (1 ng/ml) unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen fanden sich keine Effekte (n=3, Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend bewirkte E2 bei OASFs eine Steigerung der BAFF-Sekretion. RASFs wurden in Bezug auf die BAFF-Sekretion nicht beeinflusst.

### **3.8.5 Einfluss von E2 auf die BAFF-Sekretion bei verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ und zu verschiedenen Zeitpunkten**

Da sich in vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass E2 die BAFF-Sekretion von SFs beeinflussen kann, wurde der Zusammenhang zwischen Stimulation mit IFN- $\gamma$  sowie E2 und der BAFF-Sekretion detaillierter untersucht.

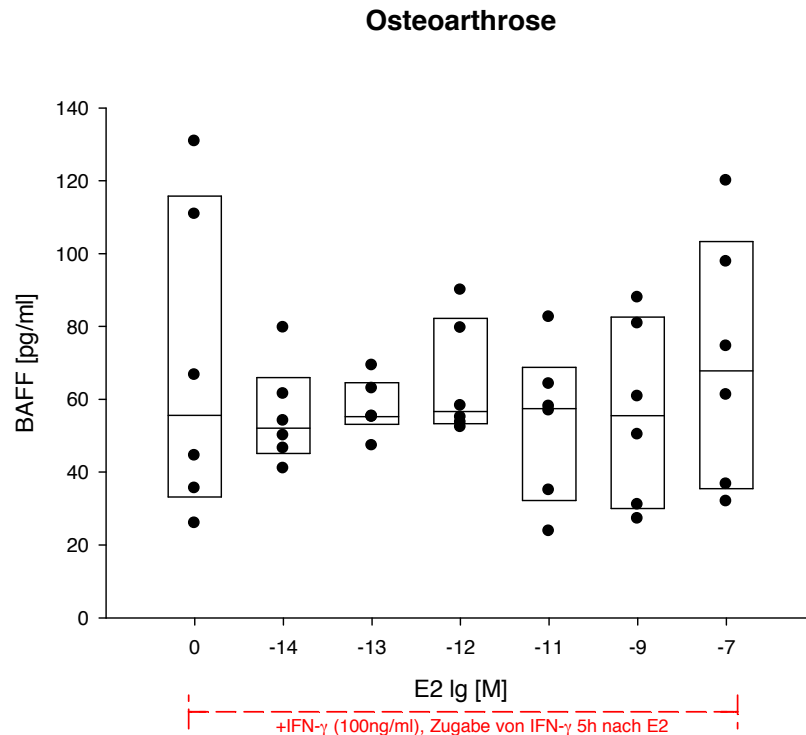
E2 übt seine Effekte hauptsächlich über Veränderung der Gentransduktion aus. Dies geschieht mit gewisser zeitlicher Latenz (115–119). Um herauszufinden, ob die zeitliche Latenz bei der Beeinflussung der BAFF-Sekretion eine Rolle spielt, wurden die SFs mit E2 in den Konzentrationen  $10^{-14}\text{M}$ ,  $10^{-13}\text{M}$ ,  $10^{-12}\text{M}$ ,  $10^{-11}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$  fünf Stunden vor, zeitgleich mit oder fünf Stunden nach Zugabe von IFN- $\gamma$  in den Konzentrationen 0,1ng/ml, 0,5ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml und 100ng/ml über 48 Stunden stimuliert. Die erhaltenen BAFF-Werte wurden mit denen der alleinigen Stimulation mit IFN- $\gamma$  in den entsprechenden Konzentrationen verglichen. BAFF wurde mittels eines selbst gecoateten ELISA detektiert (siehe Material und Methoden).

#### **a) Zugabe von IFN- $\gamma$ und E2 zur gleichen Zeit**

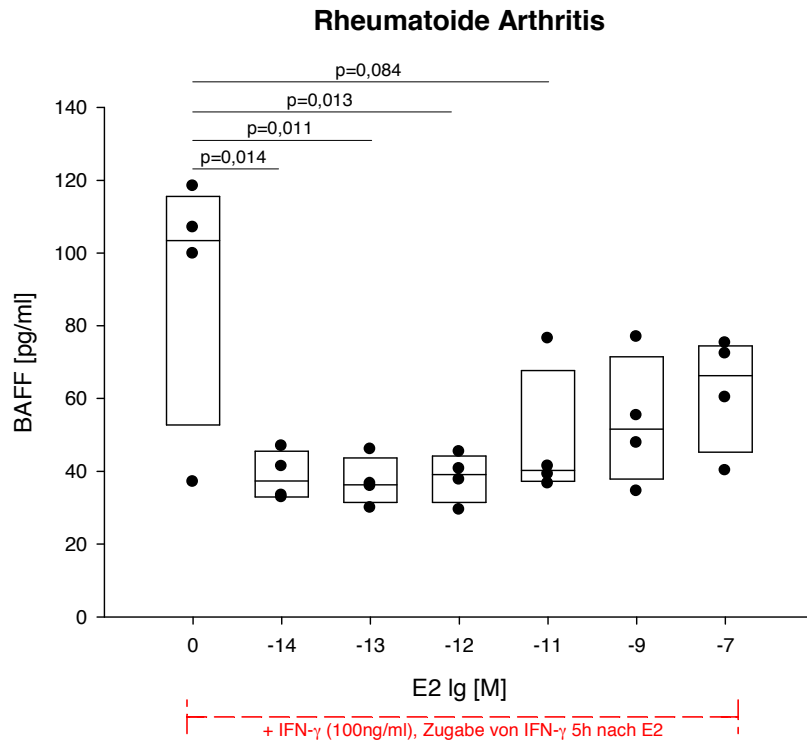
Bei zeitgleicher Zugabe von IFN- $\gamma$  und E2 zeigten sich weder bei OASFs noch bei RASFs signifikante Einflüsse auf die BAFF-Sekretion (Daten nicht gezeigt).

#### **b) Zugabe von E2 fünf Stunden vor IFN- $\gamma$**

Wenn IFN- $\gamma$  fünf Stunden nach E2 zugegeben wurde, ergab sich bei einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 100ng/ml bei RASFs eine Hemmung der BAFF Sekretion zwischen der nur mit IFN- $\gamma$  (100ng/ml) stimulierten Kontrolle und IFN- $\gamma$  mit E2 in Höhe von  $10^{-14}\text{M}$ ,  $10^{-13}\text{M}$ ,  $10^{-12}\text{M}$  sowie  $10^{-11}\text{M}$  (Abb. 3.27). Bei OASFs zeigten sich keine Effekte (Abb. 3.26).



**Abbildung 3.26:** Einfluss von E2 auf die BAFF Sekretion von OASFs bei Zugabe von E2 fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (100ng/ml),  $n=6$ , Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist.



**Abbildung 3.27:** Einfluss von E2 auf die BAFF Sekretion von RASFs bei Zugabe von E2 fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (100ng/ml), n=4, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulussubstanzen wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Für alle weiteren Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (0,1ng/ml, 0,5ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml) ergaben sich keine signifikanten Effekte (Daten nicht gezeigt).

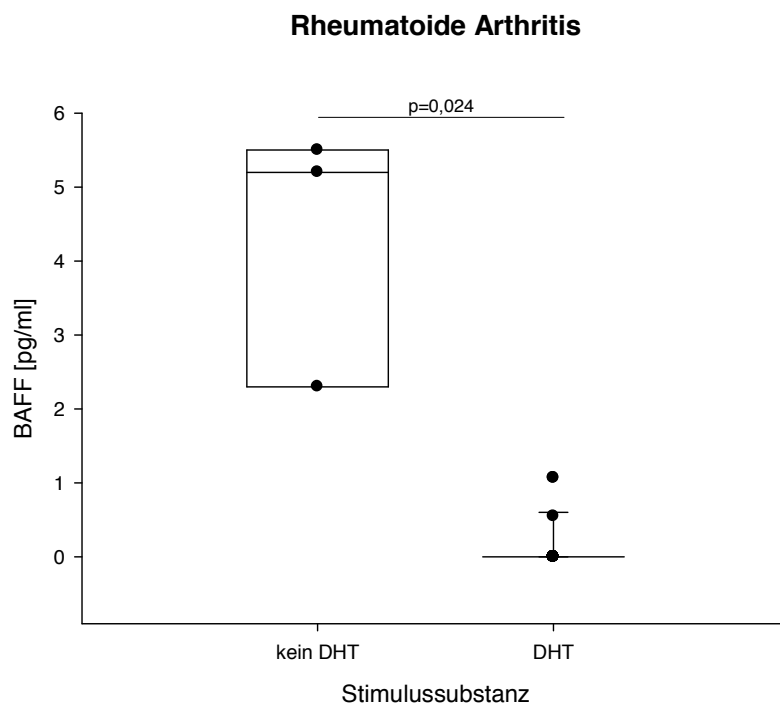
### c) Zugabe von IFN- $\gamma$ fünf Stunden vor E2

Es fanden sich weder bei OASFs noch bei RASFs signifikante Effekte (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigte sich, dass die zeitliche Latenz der E2-vermittelten Effekte tatsächlich von Relevanz ist. E2 konnte im vorliegenden Versuchsaufbau nur dann die BAFF-Sekretion der SFs vermindern, wenn es fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  zugegeben wurde. Insgesamt hatte E2 jedoch auch dann nur wenige Effekte bei einer hohen Konzentration von IFN- $\gamma$ .

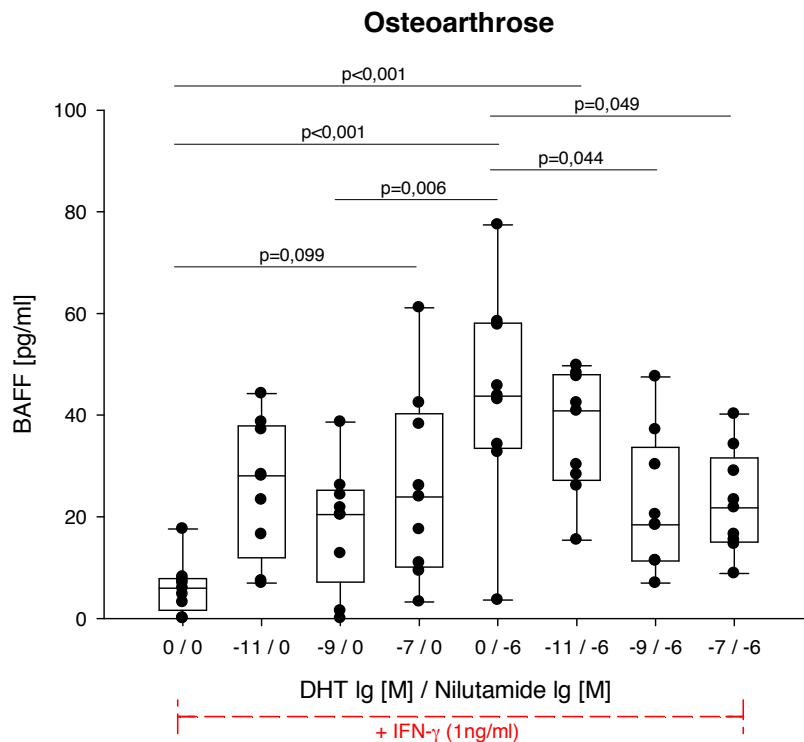
### 3.8.6 DHT und/oder Nilutamide

Androgenen wird bei entzündlichen Erkrankungen eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen (121, 122). Inwiefern Androgene die BAFF-Sekretion von SFs beeinflussen, wurde durch 72-stündige Stimulation mit DHT und/oder dessen Antagonist Nilutamide in den Konzentrationen  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-8}\text{M}$ ,  $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-10}\text{M}$ ,  $10^{-11}\text{M}$  bzw.  $10^{-12}\text{M}$  überprüft. Dabei zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test bei RASFs eine signifikante Minderung der BAFF-Sekretion nach Inkubation mit DHT im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.28). Bei OASFs war vor und nach Stimulation kein messbares BAFF vorhanden ( $n=3$ , Daten nicht gezeigt). Die Messung von BAFF im Überstand erfolgte mittels des „Quantikine® ELISA Human BAFF/BLyS/TNFSF13B“ (R&D, Minneapolis, USA).

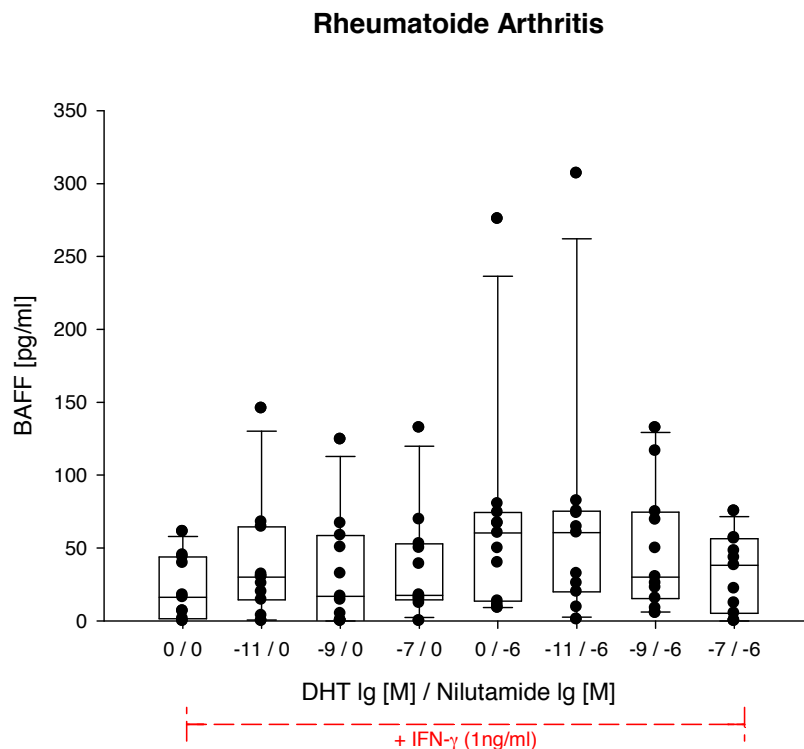


**Abbildung 3.28:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von RASFs,  $n=3$ , Inkubation über 72 Stunden. Der Vergleich beider Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test. Die Art der Stimulation (kein DHT vs. DHT) wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

Bei zeitgleicher Stimulation mit DHT und/oder Nilutamide und IFN- $\gamma$  (1ng/ml) ergab sich bei OASFs eine Steigerung der BAFF-Sekretion durch Zugabe des Antiandrogens Nilutamide im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle, die jedoch nach Zugabe von DHT zu Nilutamide rückgängig war (Abb. 3.29). Bei RASFs fanden sich keine Effekte von DHT und/oder Nilutamide auf die BAFF-Sekretion (Abb. 3.30).



**Abbildung 3.29:** Einfluss von DHT und/oder Nilutamide auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml),  $n=9$ , Inkubation über 72h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.30:** Einfluss von DHT und/oder Nilutamide auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=11, Inkubation über 72h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

Bei gleichem Stimulationsschema mit IFN- $\gamma$  (10ng/ml) statt IFN- $\gamma$  (1ng/ml) ergab sich kein Einfluss von DHT und/oder Nilutamide auf die BAFF-Sekretion (n=3, Daten nicht gezeigt).

Die Zugabe des Antiandrogens Nilutamide bewirkte bei OASFs zusammenfassend eine Steigerung der BAFF-Sekretion, die nach Zugabe von DHT zu Nilutamide wieder rückgängig war. Bei RASFs waren keine Effekte zu beobachten.

### 3.8.7 Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion bei verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ und zu verschiedenen Zeitpunkten

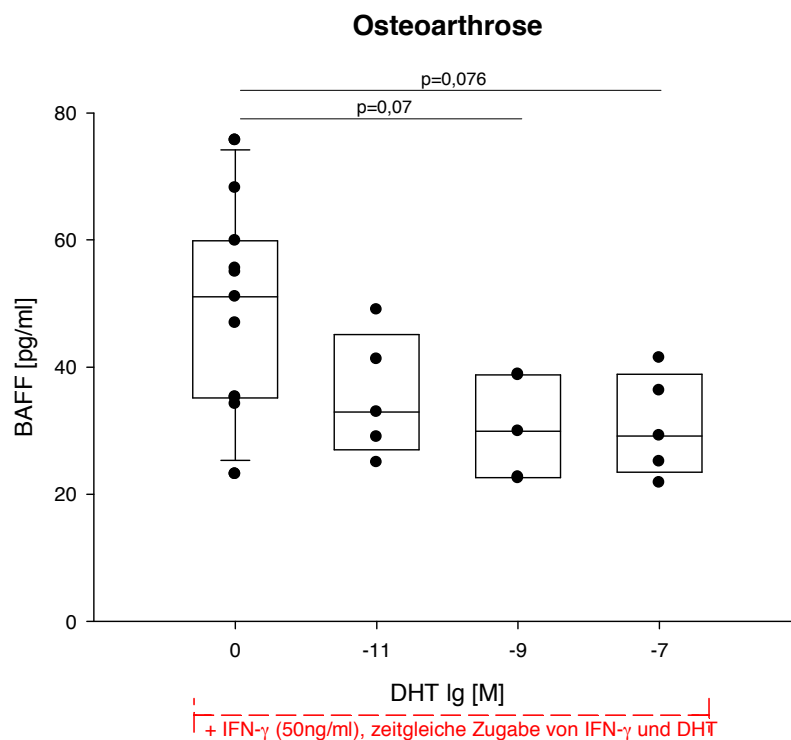
Genau wie für E2 wurde im Anschluss die Bedeutung der zeitversetzten Zugabe von DHT für die BAFF-Sekretion bei Stimulation mit INF- $\gamma$  und DHT untersucht. Dazu



wurden die Zellen mit DHT in den Konzentrationen  $10^{-14}$  M,  $10^{-13}$  M,  $10^{-12}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$  M und  $10^{-7}$  M fünf Stunden vor, zeitgleich mit oder fünf Stunden nach Zugabe von IFN- $\gamma$  in den Konzentrationen 0,1ng/ml, 0,5ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml, 50ng/ml und 100ng/ml über 48 Stunden stimuliert. Die Messung des BAFF in den Überständen erfolgte mittels des selbst gecoateten ELISA (siehe Material und Methoden). Die erhaltenen BAFF-Werte wurden mit denen der alleinigen Stimulation mit IFN- $\gamma$  in den entsprechenden Konzentrationen verglichen.

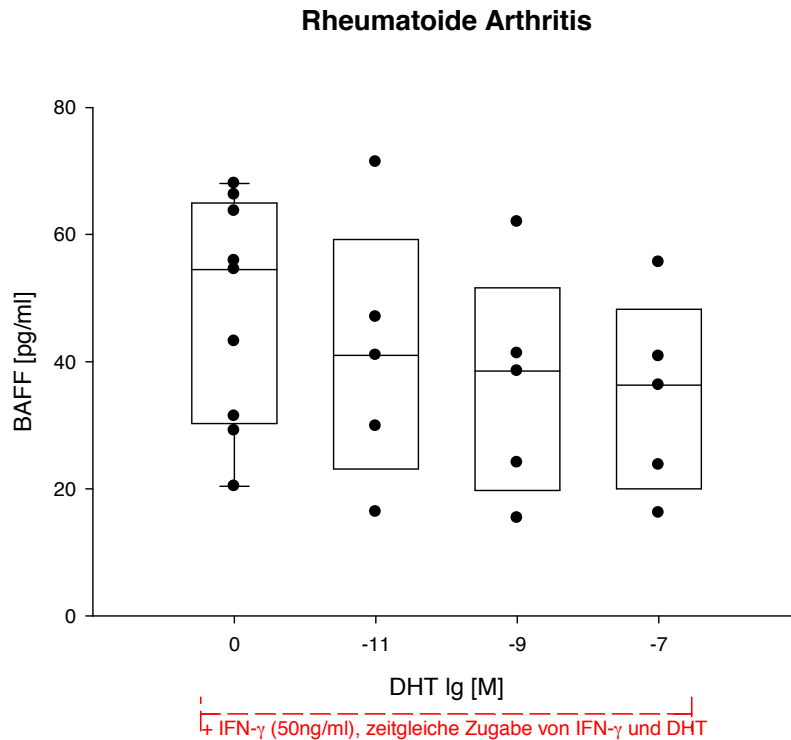
#### a) Zugabe von DHT und IFN- $\gamma$ zur gleichen Zeit

Bei zeitgleicher Zugabe von IFN- $\gamma$  und DHT ergab sich nur bei OASFs bei einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 50ng/ml ein statistischer Trend zur Verringerung der BAFF-Sekretion durch DHT im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  (50ng/ml) stimulierten Kontrolle (Abb. 3.31). Bei RASFs ergab sich bei dieser IFN- $\gamma$  Konzentration kein Effekt (Abb. 3.32).



**Abbildung 3.31:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei zeitgleicher Zugabe von IFN- $\gamma$  (50ng/ml) und DHT, n=5 bis n=11, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten

entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



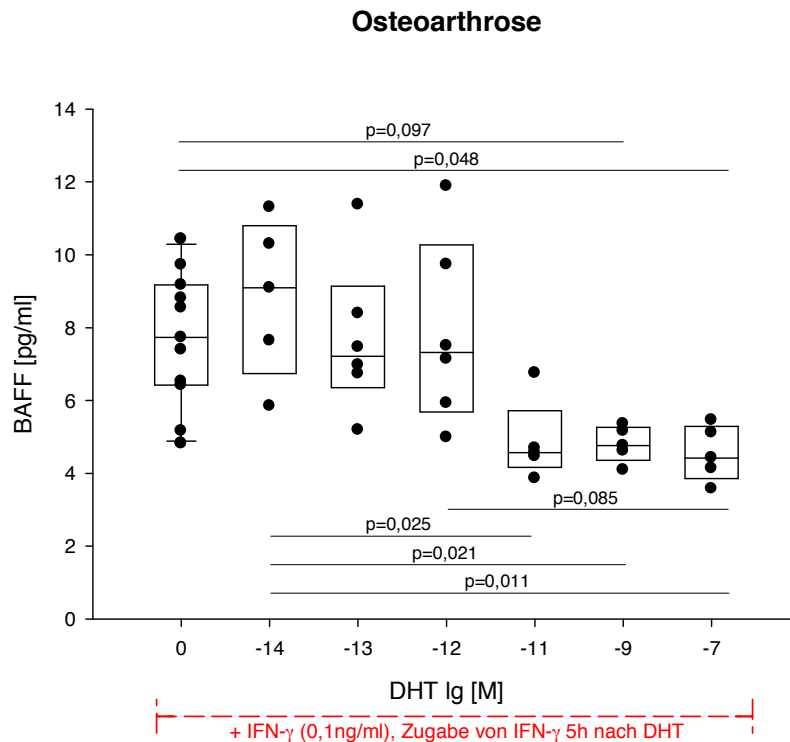
**Abbildung 3.32:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei zeitgleicher Zugabe von IFN- $\gamma$  (50ng/ml) und DHT, n=5 bis n=9, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

Bei allen weiteren verwendeten Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (0,1ng/ml, 0,5ng/ml, 1ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml) zeigten sich weder bei OASFs noch bei RASFs statistisch signifikante Effekte (Daten nicht gezeigt).

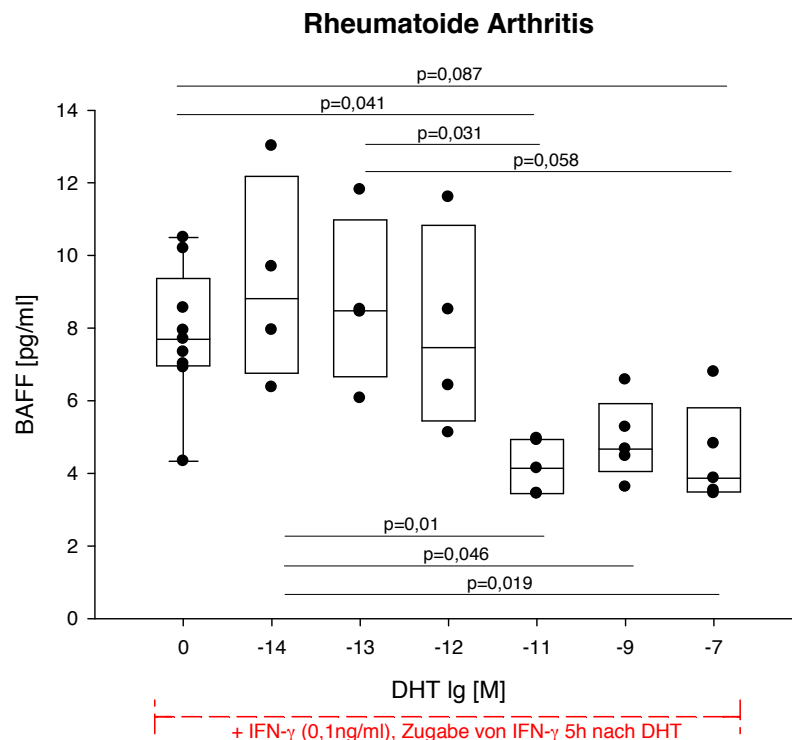
## b) Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$ =0,1ng/ml

Bei einer IFN-Konzentration von 0,1ng/ml wurde bei OASFs und RASFs die BAFF-Sekretion durch höhere DHT-Spiegel im Vergleich zu geringeren DHT-Konzentrationen bzw. der Kontrolle ohne DHT gehemmt (Abb. 3.33 und 3.34).



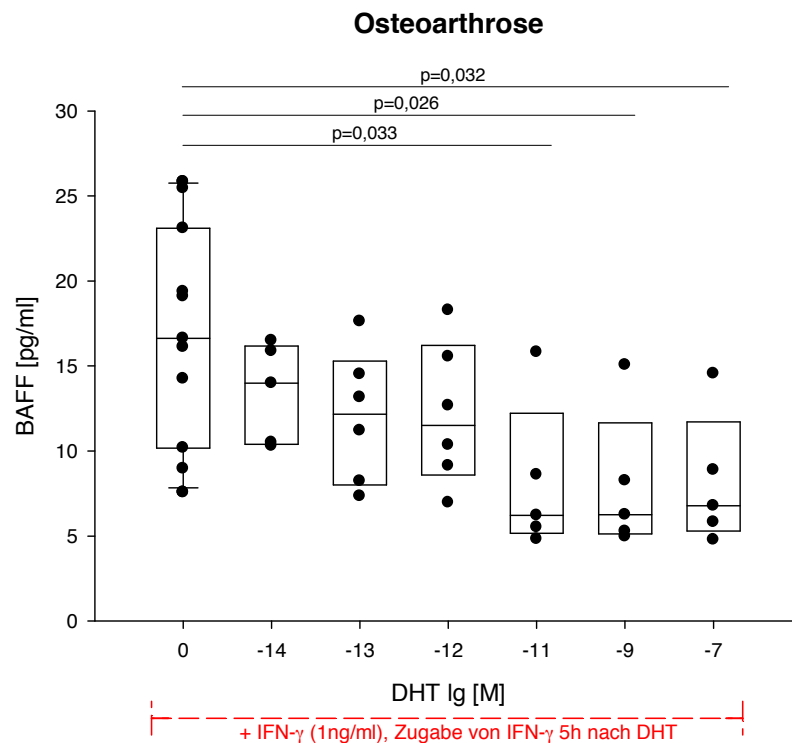
**Abbildung 3.33:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (0,1ng/ml),  $n=5$  bis  $n=11$ , Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.34:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (0,1ng/ml),  $n=4$  bis  $n=9$ , Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

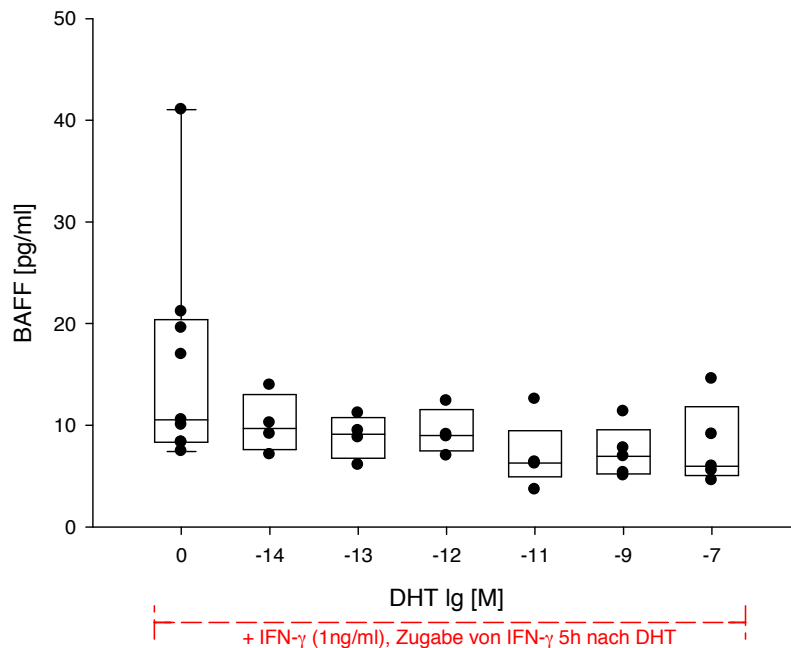
IFN- $\gamma$ =1ng/ml

Nach Stimulation mit 1ng/ml IFN- $\gamma$  waren die gemessenen BAFF-Werte bei OASFs nach Zugabe von DHT in Höhe von  $10^{-11}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-7}$ M signifikant niedriger als die der nur mit IFN- $\gamma$  (1ng/ml) stimulierten Kontrollen (Abb. 3.35). Bei RASFs fand sich kein derartiger Zusammenhang (Abb. 3.36).



**Abbildung 3.35:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=5 bis n=11, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

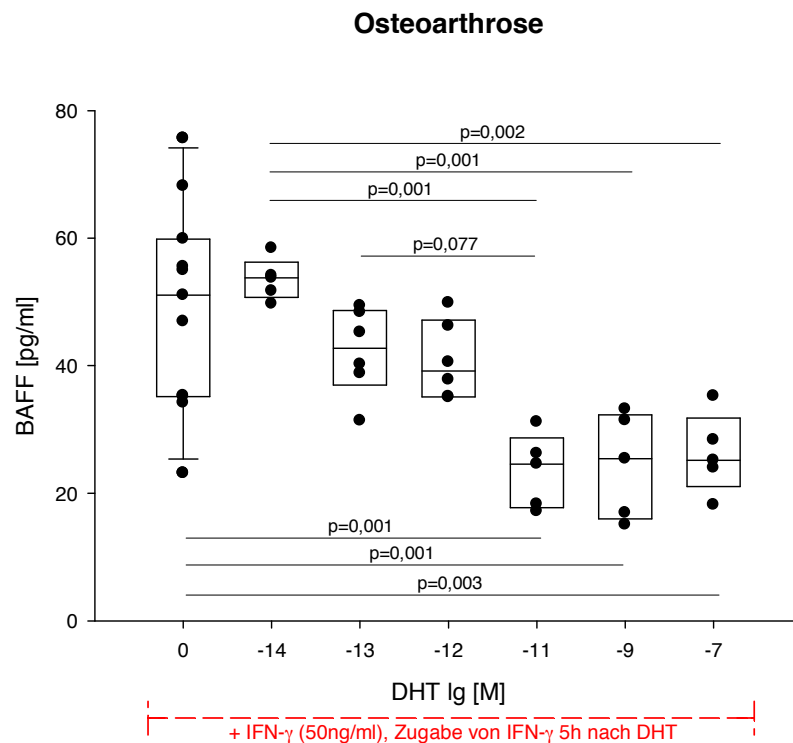
## Rheumatoide Arthritis



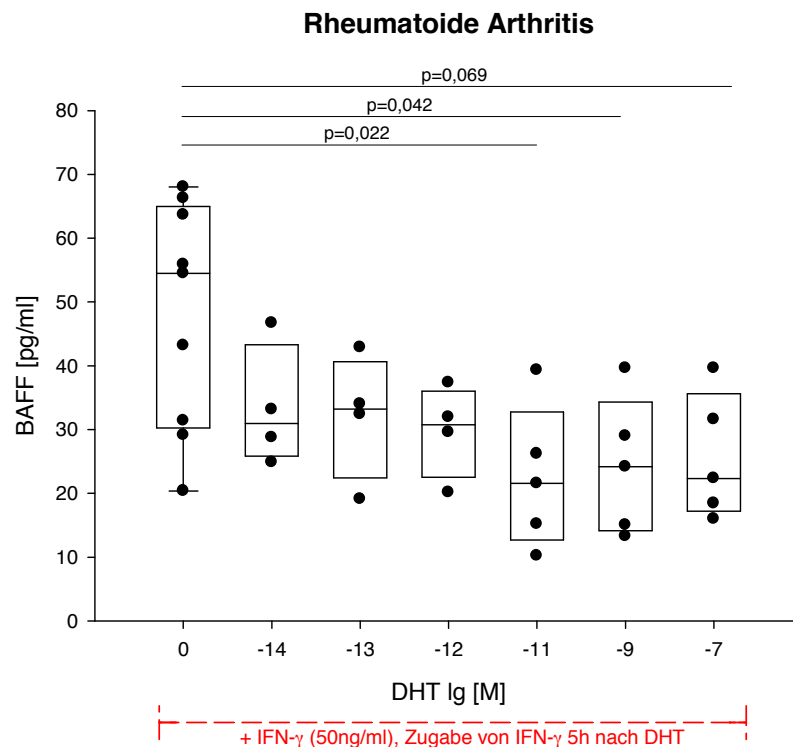
**Abbildung 3.36:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (1ng/ml), n=4 bis n=9, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile.

IFN- $\gamma$ =50ng/ml

Bei Inkubation mit IFN- $\gamma$  50ng/ml war bei OASFs eine Hemmung der BAFF-Sekretion durch Zugabe von DHT in Höhe von  $10^{-11}$ M,  $10^{-9}$ M, bzw.  $10^{-7}$ M fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  vs. der nur mit IFN- $\gamma$  (50ng/ml) inkubierten Kontrolle erkennbar. Auch im Vergleich zur Stimulation mit der geringen DHT-Konzentration  $10^{-14}$ M in Kombination mit IFN- $\gamma$  (50ng/ml) hemmten die höheren DHT-Spiegel in Kombination mit IFN- $\gamma$  (50ng/ml) die BAFF-Sekretion signifikant (Abb. 3.37). Bei RASFs war eine Minderung des BAFF-Spiegels bei hohen DHT-Spiegeln im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle festzustellen (Abb. 3.38).



**Abbildung 3.37:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von OASFs bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (50ng/ml), n=5 bis n=11, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.38:** Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion von RASFs bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  (50ng/ml),  $n=4$  bis  $n=9$ , Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten BAFF auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem BAFF-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der BAFF-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die zehnte bzw. neunzigste Perzentile. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

IFN- $\gamma$ =100ng/ml

Bei einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 100ng/ml war bei RASFs eine Hemmung von BAFF bei der Kombination von IFN- $\gamma$  (100ng/ml) mit DHT in Höhe von  $10^{-14}$ M ( $p=0,1$ ) bzw.  $10^{-12}$ M ( $p=0,07$ ) im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  (100ng/ml) stimulierten Kontrolle mit statistischem Trend erkennbar. Bei OASFs fanden sich keine Effekte (Daten nicht gezeigt).

Für alle weiteren Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (0,5ng/ml, 5ng/ml, 10ng/ml) fanden sich keine Effekte (Daten nicht gezeigt).



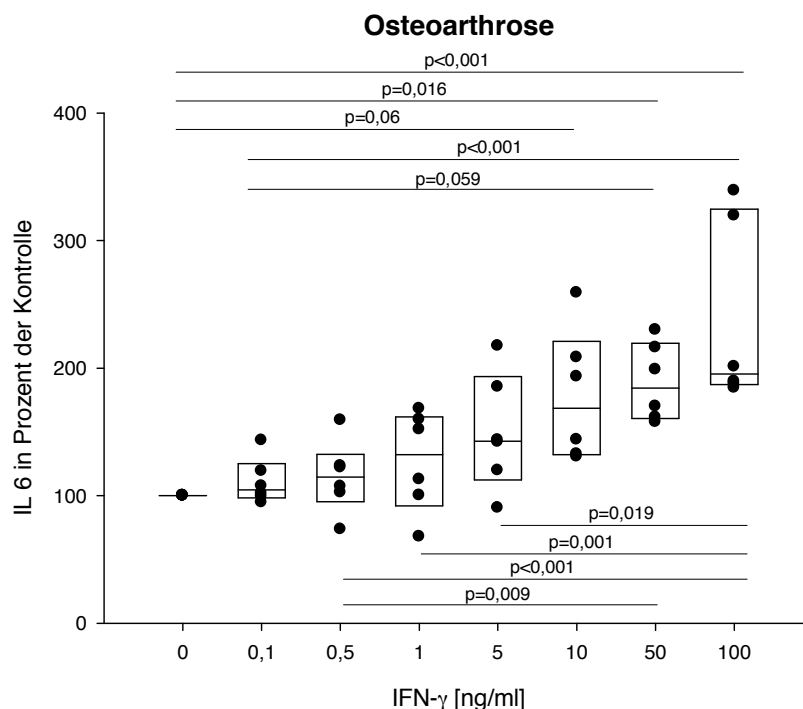
### c) Zugabe von IFN- $\gamma$ fünf Stunden vor DHT

Bei Zugabe von DHT fünf Stunden nach IFN- $\gamma$  zeigten sich weder bei OASFs noch bei RASFs signifikante Einflüsse auf die BAFF-Sekretion der SFs (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigte sich, dass genau wie bei E2 auch bei DHT eine zeitliche Latenz der DHT-vermittelten Effekte eine wichtige Rolle spielt. DHT konnte im vorliegenden Versuchsaufbau die BAFF-Sekretion der SFs vermindern, wenn es fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  zugegeben wurde. Dann konnte DHT schon bei geringen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  die BAFF-Werte senken.

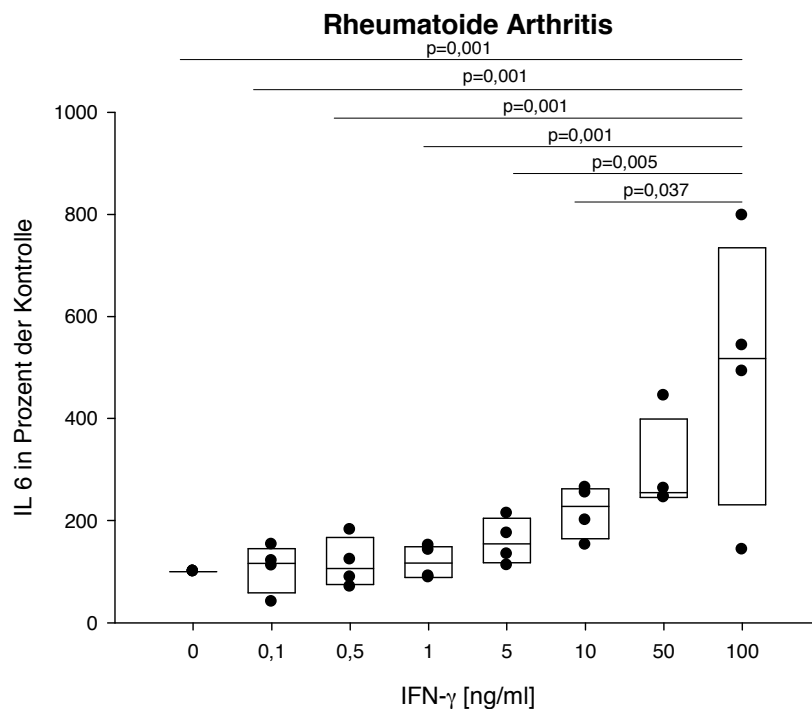
## 3.9 Einfluss von IFN- $\gamma$ auf die IL-6-Sekretion von SFs

Genau wie die BAFF-Sekretion wird auch die Höhe des von den SFs sezernierten IL-6 durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  beeinflusst. Sowohl bei OASFs als auch bei RASFs zeigte sich eine Zunahme der IL-6-Produktion durch steigende Konzentrationen von IFN- $\gamma$  (Abb. 3.39 und 3.40).



**Abbildung 3.39:** Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die IL-6-Sekretion von OASFs, n=6, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten IL-6 auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem IL-6-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots

enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.



**Abbildung 3.40:** Einfluss von IFN- $\gamma$  auf die IL-6-Sekretion bei RASFs, n=4, Inkubation über 48h. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni-Korrektur. Die Art der Stimulation wird auf der x-Achse dargestellt, die Höhe des sezernierten IL-6 auf der y-Achse. Jeder Punkt entspricht dabei dem IL-6-Wert eines Patienten, wobei doppelt vorkommende Werte nur einfach abgebildet werden. Die in den vertikalen Box-Whisker-Plots enthaltenen Daten entsprechen den mittleren 50% der IL-6-Werte, wobei der Median der Ergebnisse als durchgängiger Strich eingezeichnet ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind als horizontale Striche unter Angabe des p-Wertes dargestellt.

### 3.10 Zusammenfassung

Stimulus	OASFs	RASFs
IFN- $\gamma$	↑	↑
Passage	↔	↔
Passage + IFN- $\gamma$	↔	↔
Poly(I:C)	↔	↔
Poly(I:C) + IFN- $\gamma$	↓	↓
IL-10	↔	↓
IL-10 + IFN- $\gamma$	↑	↔
Resiniferatoxin	↔	↓
Resiniferatoxin + IFN- $\gamma$	↑	↔
Adrenozeptoragonisten / Adrenozeptorantagonisten	↔	↔
DPN + IFN- $\gamma$	↑	↔
PPT + IFN- $\gamma$	↑	↔
G1 + IFN- $\gamma$	↔	↔
E2	↔	↓
E2 + IFN- $\gamma$	↑*	↓*
DHT	↔	↓
DHT + IFN- $\gamma$	↓*	↓*

**Tabelle 3.1:** Einfluss verschiedener Stimuli auf die BAFF-Sekretion von SFs. Bei einzelndem Stimulus erfolgt der Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, bei einem Stimulus in Kombination mit IFN- $\gamma$  zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle. Pfeile nach oben bedeuten eine Steigerung der BAFF-Sekretion, Pfeile nach unten eine Minderung der BAFF-Sekretion, waagerechte Pfeilen zeigen an, dass sich die BAFF-Sekretion nicht verändert. \*: zeitgleiche Zugabe von IFN- $\gamma$  und E2 mit Stimulation über 72h, \*: Zugabe von E2 bzw. DHT 5h vor IFN- $\gamma$  mit Stimulation über 48h.

## 4. Diskussion

Seit die Effektivität der B-Zell-Depletion durch Rituximab bei der RA erkannt worden war, sind B-Zellen, ihre Rolle bei Autoimmunerkrankungen und die daraus entstehenden therapeutischen Möglichkeiten verstärkt in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt (145). Der B-Zell-aktivierende Faktor BAFF wird in diesem Zusammenhang als einer der entscheidenden Regulatoren des B-Zell-Pools angesehen und gilt bei der RA als wichtiger Faktor bei der Selektion autoaggressiver B-Zellen (101, 108, 146, 147). Da Fibroblasten im synovialen Gewebe eine der Quellen von BAFF darstellen (105, 141), wurde in der vorliegenden Arbeit die Beeinflussung der BAFF-Sekretion von SFs durch pro- bzw. antiinflammatorische Zytokine, Liganden des angeborenen Immunsystems und verschiedene neuroendokrine Faktoren untersucht.

Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurde zunächst gemessen, ob SFs auch ohne Stimulation durch oben genannte Substanzen BAFF sezernieren. Da in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit inflammatorischer Arthritis höhere Werte an BAFF messbar sind als in der von Patienten mit nichtentzündlicher Gelenkpathologie (OA und Trauma) (148), war eine höhere Sekretion bei RASFs im Vergleich zu OASFs zu erwarten. Bei sehr kleinen Patientengruppen war in der vorliegenden Arbeit teilweise nur bei RASFs eine spontane BAFF-Sekretion zu beobachten. Wurden die erhaltenen Ergebnisse aller Versuche jedoch zusammen ausgewertet, konnte in diesem sehr viel größeren Kollektiv kein Unterschied in der basalen BAFF-Sekretion zwischen OASFs und RASFs mehr festgestellt werden (Versuch 3.1). Dieses Ergebnis bestätigt hier eine Studie von Alsaleh et al., die ähnliche Befunde gezeigt hatte (107). Ein entscheidender Einfluss des lokalen inflammatorischen Milieus auf die BAFF-Produktion könnte die im Vergleich zu Kontrollen höheren BAFF-Spiegel in der Synovia der RA-Patienten erklären (97, 148). Die weiteren Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Hypothese: Erst nach Stimulation mit verschiedenen pro- oder antientzündlichen Substanzen waren Unterschiede in der BAFF-Sekretion zwischen OASFs und RASFs festzustellen.

Sowohl bei der OA als auch bei der RA sind entzündliche Prozesse für den Krankheitsprozess von Bedeutung, wenn auch bei der OA viel weniger stark ausgeprägt als bei der RA (149). Obwohl bei der OA ein Knorpelschaden als

ursächlich für den Beginn der pathogenetischen Reaktion angenommen wird und bei der RA die in der Einleitung beschriebenen autoimmunen Mechanismen Bedeutung haben, sind die inflammatorischen Prozesse selbst und das dadurch entstehende Zytokinmilieu bei beiden Formen der Synovitis ähnlich, wenn auch in deutlich unterschiedlicher Ausprägung (1, 149, 150). Unterschiede in der Reaktion von OASFs und RASFs auf die in dieser Arbeit getesteten Stimuli können aus leichten Unterschieden in der Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit oder per se bzw. dadurch bedingter verschiedener Expression entsprechender Rezeptoren für die proinflammatorischen Mediatoren resultieren (106, 151, 152). Auch epigenetische Veränderungen können die Reaktionsmuster der SFs beeinflussen (25).

### IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  ist ein Zytokin, welches viele proinflammatorische Effekte ausüben kann (153–155). Nach Bindung an den IFN- $\gamma$  Rezeptor führt es überwiegend zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (153, 155). Dies bewirkt die verstärkte Expression verschiedener Zytokingene über die Bindung von STAT1 an die entsprechenden Promotoren (153). Für humane intestinale Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Produktion von BAFF nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  über eben diesen Signalweg induziert wird (156). Auch bei OASFs und RASFs steigert die Inkubation mit IFN- $\gamma$  die BAFF-Produktion und -Sekretion (139–141). In der vorliegenden Arbeit konnte die konzentrationsabhängige Steigerung der BAFF-Sekretion von SFs nach Stimulation mit INF- $\gamma$  bestätigt werden.

### Passagierung

Danach wurde die durch IFN- $\gamma$  stimulierte BAFF-Sekretion von SFs über 10 Passagen gemessen und untersucht, ob sich diese durch die zunehmende Passagierung verändert. Sowohl bei OASFs als auch bei RASFs hatte die Passage der SFs keinen Einfluss auf die Menge an detektierbarem BAFF. Frühere Arbeiten hatten eine veränderte Genexpression von RASFs durch zunehmende Passagierung beschrieben (157–160). Allerdings wurde in diesen Studien die Expression verschiedener Gene verglichen, während in der vorliegenden Arbeit sezerniertes BAFF gemessen wurde. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten in unterschiedlichen Passagen für die Versuche verwendet werden konnten.

### Poly(I:C)

Das angeborene Immunsystem kann doppelsträngige RNA, die bei Virusinfektionen freigesetzt wird, durch den TLR-3 erkennen (161). Auch RASFs werden durch Stimulation via TLR-3 aktiviert. Dies geschieht durch RNA, die von nekrotischen Zellen im entzündlichen Milieu der Synovia freigesetzt wird (33). Die Expression des TLR-3-Rezeptors in RASFs wird durch IL-17 induziert und der Entzündungsstatus bei der RA ist mit einer erhöhten Expression von TLR-3 assoziiert (162, 163). Dass die Aktivierung von TLR-3 zur Sekretion von BAFF und so zum gesteigerten Überleben autoreaktiver B-Zellen führt, wurde von Bombardieri et al. für RASFs und OASFs gezeigt. In deren Studie war eine deutliche Steigerung der BAFF-Sekretion durch Stimulation des TLR-3 mittels dessen Agonist Poly(I:C) zu beobachten (164), die hier nicht reproduziert werden konnte. Weder bei OASFs noch bei RASFs konnte eine signifikante Steigerung der BAFF-Sekretion nach Poly(I:C) gemessen werden, wobei der Grund hierfür unklar ist. Anders verhielt es sich nach zeitgleicher Inkubation von SFs mit IFN- $\gamma$  und Poly(I:C). Sowohl bei OASFs als auch bei RASFs war eine Abnahme an sezerniertem BAFF zu beobachten. Eine Minderung der BAFF-Sekretion bei zeitgleicher Inkubation von RASFs mit IFN- $\gamma$  und Liganden des TLR-2, -4 und -9 war von Alsaleh et al. beschrieben worden: Der Grund dafür ist eine verminderte IFN- $\gamma$  induzierte Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1 bei SFs in Gegenwart von TLR-Liganden (139). Da IFN- $\gamma$  die Zytokinproduktion und eben auch die BAFF-Sekretion über STAT1 anregt (153, 156), resultiert aus der Hemmung von STAT1 eine verminderte Sekretion dieser Entzündungsmediatoren. Die Inhibition von STAT1 nach TLR-Aktivierung kann jedoch auch durch Mediation über *suppressor of cytokine signalling 1* (SOCS1) und SOCS3 entstehen (165). IL-6 induziert die Expression von SOCS3 (166). Die BAFF-Expression kann über verstärkte SOCS3-Expression reduziert werden (167). Da zeitgleiche Stimulation mit IFN- $\gamma$  und Poly(I:C) die IL-6 Sekretion steigert (168), könnte die verminderte BAFF-Sekretion nicht nur über den vermuteten direkten Weg der reduzierten Aktivität von STAT1 entstehen, sondern auch über Mediation durch IL-6. Dieser Effekt scheint abhängig vom Zelltyp zu sein, da IFN- $\gamma$  und Liganden von TLR-3 wie Poly(I:C) z. B. Makrophagen zu deutlich gesteigerter Zytokinproduktion anregen (169).

### IL-10

IL-10 inhibiert die Produktion entzündlich wirkender Zytokine über Aktivierung von STAT3 (170). STAT3 wiederum erhöht die Aktivität von SOCS3 (171), welches, wie schon bei Poly(I:C) beschrieben, die BAFF-Expression vermindert (167). Erwartungsgemäß sank in der vorliegenden Arbeit bei RASFs die BAFF-Sekretion nach IL-10-Stimulation.

Bei zeitgleicher Inkubation von SFs mit IFN- $\gamma$  und IL-10 stieg die Sekretion des proinflammatorischen BAFF bei OASFs jedoch an. Ein solcher Anstieg von sezerniertem BAFF nach Stimulation mit IL-10 und IFN- $\gamma$  war in ähnlicher Weise schon bei Promyelozyten beobachtet worden, wo diese Kostimulation eine verstärkte Aktivität am BAFF-Promotor bewirkte (172). Dies geschieht, indem durch Inkubation mit IFN- $\gamma$  und IL-10 durch IL-10 nicht mehr wie unter nicht-entzündlichen Bedingungen STAT3, sondern nun STAT1 induziert wird (173). Da durch STAT1 die vermehrte BAFF-Produktion über Aktivierung des BAFF-Promotors angeregt wird (156), könnte dieser Mechanismus auch der Steigerung der BAFF-Sekretion bei zeitgleicher Inkubation von SFs mit IFN- $\gamma$  und dem eigentlich antiinflammatorisch wirksamen Zytokin IL-10 zugrunde liegen. Die Steigerung der BAFF-Sekretion durch IL-10 im entzündlichen Milieu passt zu den Ergebnissen verschiedener Studien, wo IL-10 bei inflammatorischen Erkrankungen als krankheitsverstärkender Faktor identifiziert wurde (174). Bei RASFs war in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss auf die BAFF-Sekretion durch zeitgleiche Stimulation mit IFN- $\gamma$  und IL-10 zu beobachten. RASFs können im Gegensatz zu OASFs die  $\alpha$ -Untereinheit des IL-10 Rezeptors nur schwach ausbilden. Dieser inkomplette Rezeptor fällt unter nicht entzündlichen Bedingungen nicht ins Gewicht, aufgrund fehlender Hochregulation im proinflammatorischen Milieu können RASFs dort jedoch nicht adäquat wie OASFs auf IL-10-Stimulation reagieren (175).

### Resiniferatoxin

Auf Synoviozyten von Patienten mit inflammatorischer Arthropathie konnte gezeigt werden, dass über TRPV-Kanäle die zytosolische Kalziumkonzentration reguliert wird (144). Bei RASFs und OASFs bewirkt eine Stimulation von TRPV1 eine verstärkte Produktion von IL-6 (143). IL-6 kann über Induktion von SOCS3 (166) wie bereits oben beschrieben die BAFF-Sekretion vermindern (167). Außerdem reduziert

die Aktivierung von TRPV1 in Makrophagen die interferonabhängige Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1 (153, 176), was zu einer verminderten BAFF-Produktion führt. Die Stimulation von SFs mit dem TRPV1-Agonisten Resiniferatoxin ließ deshalb eine Minderung der BAFF-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erwarten. Bei RASFs konnte dies auch so gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu steigerte der TRPV1-Agonist Resiniferatoxin in Kombination mit IFN- $\gamma$  jedoch bei OASFs die BAFF-Sekretion. Ein möglicher Mechanismus ist dabei die Aktivierung von Furin Proteasen durch TRPV1 vermittelten Calcium-Einstrom (144, 177). Furin ist eine Proteinkonvertase, die eine Vielzahl an Proteinen wie Adhäsionsmoleküle, Metalloproteinasen oder Wachstumsfaktoren durch Proteolyse in die biologisch aktive Form überführen kann (178, 179). Furin spaltet BAFF von der Membran ab und überführt es in seine lösliche Form (180–182), eine verstärkte Aktivität könnte demnach zu höheren BAFF Spiegeln führen. RASFs und OASFs exprimieren den TRPV1-Kanal in gleichem Maß (143), sodass die unterschiedliche Reaktion von RASFs und OASFs in diesem Versuch nicht über unterschiedliche Rezeptorexpression erklärt werden kann. Allerdings ist Furin im rheumatoid veränderten Gewebe in viel höherem Maß vorhanden als bei gesunden Kontrollen (179). Demnach könnte das fehlende Ansprechen bei RASFs durch das basal bereits erhöhte Furin-Niveau und die möglicherweise nicht mehr weiter steigerbare BAFF-Proteolyse erklärt werden, dies muss jedoch in weiteren Experimenten überprüft werden.

#### Adrenozeptoragonisten und -antagonisten

Das autonome Nervensystem spielt eine wichtige Rolle bei autoimmunen Erkrankungen wie der RA. Durch den entzündlichen Prozess steigt die systemische Aktivität des sympathischen Nervensystems an, um genügend Energie für das aktivierte Immunsystem bereitzustellen. Im Gegensatz dazu sinkt lokal im synovialen Gewebe die Dichte sympathischer Nervenfasern, während die der sensorischen konstant bleibt oder leicht zunimmt. Dadurch können weniger antientzündliche Signale transduziert werden, wobei gleichzeitig die von den sensorischen Fasern freigesetzten Neuropeptide die lokale entzündliche Reaktion steigern. Im Falle einer akuten Entzündung macht diese Konfiguration Sinn, da dadurch Antigene schnell



eliminiert werden können. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der RA resultiert aus dem veränderten Verhalten des autonomen Nervensystems jedoch die Aufrechterhaltung der Inflammation (132). Die Signaltransduktion im autonomen Nervensystem geschieht über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren (129), wobei lokal die Stimulation von  $\beta$ -Rezeptoren eher antiinflammatorisch, die von  $\alpha$ -Rezeptoren eher proinflammatorisch wirkt (183–186). Welche Effekte das autonome Nervensystem bewirkt, hängt von der Verteilung der Rezeptoren auf den entsprechenden Zielzellen ab (187). Zur Expression der adrenergen Rezeptoren auf SFs finden sich aktuell keine Daten in der Literatur.

### $\beta$ -Rezeptoren

$\beta$ -Rezeptoren haben bei vielen Erkrankungen hauptsächlich antiinflammatorische Effekte (184–186). Jedoch ist im entzündlichen Milieu die  $\beta$ -Rezeptordichte vermindert, wobei die Zahl der Rezeptoren negativ mit der Krankheitsaktivität korreliert (136, 137, 187, 188). Außerdem scheinen die  $\beta$ -Rezeptoren im inflammatorischen Milieu nicht so funktionsfähig zu sein wie bei gesunden Kontrollpersonen (188, 189). In der vorliegenden Arbeit hatten die verwendeten  $\beta$ -Agonisten bzw. –Antagonisten keinen relevanten Einfluss auf die BAFF-Sekretion der SFs. Ob das fehlende Ansprechen der SFs auf Stimulation mit  $\beta$ -Rezeptoren daran liegt, dass SFs keine entsprechenden Rezeptoren exprimieren oder daran, dass die Rezeptoren zwar exprimiert werden, aber nicht ausreichend funktionsfähig sind, muss weiter untersucht werden.

### $\alpha$ -Rezeptoren

Die Rolle von  $\alpha$ -Rezeptoren bei der RA ist weniger klar als die der  $\beta$ -Rezeptoren (187). Vermutlich exprimieren bei Gesunden nur Zellen des angeborenen Immunsystems  $\alpha$ -Rezeptoren (187). Bei Patienten mit RA scheinen bei zunehmender Krankheitsdauer  $\alpha$ -Rezeptoren bei gleichzeitig abnehmender  $\beta$ -Rezeptordichte für die Signaltransduktion immer wichtiger zu werden (187, 190). So kann die Stimulation von  $\alpha_2$ -Rezeptoren die Proliferation von SFs erhöhen (187). Bei Patienten mit idiopathischer juveniler Arthritis finden sich  $\alpha_1$ -Rezeptoren auf Leukozyten, was bei gesunden Kontrollpersonen nicht der Fall ist. Die Stimulation dieser Rezeptoren bewirkt einen Anstieg von IL-6 (135, 187). In der vorliegenden Arbeit hatte die Stimulation mit Agonisten bzw. Antagonisten von  $\alpha$ -Adrenozeptoren

keinen deutlichen Einfluss auf die BAFF-Sekretion von SFs. Ob das fehlende Ansprechen der SFs auf Stimulation mit  $\alpha$ -Rezeptoren daran liegt, dass SFs keine entsprechenden Rezeptoren exprimieren oder daran, dass die Rezeptoren zwar exprimiert werden, aber nicht ausreichend funktionsfähig sind, muss weiter untersucht werden.

### Sexualhormone

Frauen sind von der RA wesentlich häufiger betroffen als Männer (111). Zudem ist das Androgen/Östrogen-Verhältnis in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit RA im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen deutlich in Richtung Östrogene verschoben (114). All diese Beobachtungen legen einen Einfluss von Sexualhormonen auf die Pathogenese der RA nahe.

### Östrogene

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, können Östrogene ihre Effekte über Aktivität an den ER- $\alpha$  und - $\beta$  sowie über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entfalten (115–117, 119). Über diese Signalmechanismen können Östrogene und entsprechende Rezeptoragonisten Einfluss auf die Proliferation autoreaktiver B-Zellen ausüben und die Rekombination und den Klassenwechsel von Immunglobulinen induzieren (191).

#### Stimulation des ER- $\alpha$

Khalkhali et al. hatten gezeigt, dass SFs den ER- $\alpha$  exprimieren und dass vermehrte Signaltransduktion über diesen Rezeptor die Gelenkzerstörung fördert (192). Zeitgleiche Stimulation von SFs mit dem ER- $\alpha$ -Agonisten PPT und dem Zytokin IFN- $\gamma$  hatte in der vorliegenden Arbeit eine Steigerung der BAFF-Sekretion bei OASFs bewirkt. Im Tiermodell war bei Zellen aus der Milz oder dem Knochenmark bereits erkannt worden, dass eine Stimulation mit ER- $\alpha$ -Agonisten genau wie die Stimulation mit IFN- $\gamma$  eine Steigerung der BAFF-mRNA Produktion bewirkt. Sowohl IFN- $\gamma$  als auch Agonisten am ER- $\alpha$ -Rezeptor bewirken dies über den gleichen Mechanismus, eine Erhöhung des *lupus susceptibility modifier proteins* (p202) (193, 194). Zudem erhöht IFN- $\gamma$  die Expression von ER- $\alpha$  im Tiermodell (195). Durch den synergistischen Effekt von IFN- $\gamma$  und ER- $\alpha$ -Agonisten bezüglich der BAFF-Sekretion und den steigernden Feedback-Mechanismus beider Substanzen lässt sich die in der

vorliegenden Arbeit beobachtete Steigerung der BAFF-Sekretion von SFs bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  und dem ER- $\alpha$ -Agonisten PPT erklären. Allerdings reagierten nur OASFs und keine RASFs, obwohl ER- $\alpha$  bei RASFs in deutlich höherem Maß produziert wird als bei SFs aus nicht entzündetem synovialen Gewebe (196). Das verminderte Ansprechen auf Östrogene war bereits bei Patienten mit Sjögren-Syndrom für Epithelzellen der Speicheldrüsen gezeigt worden, obwohl sich diese in der Rezeptorexpression nicht von gesunden Kontrollen unterscheiden (197). Bei Patienten mit RA hatte die medikamentöse Aktivierung des ER- $\alpha$  keine klinisch relevanten Effekte gezeigt (198). Das weniger starke Ansprechen von RASFs auf Östrogene im Vergleich zu SFs von Kontrollpersonen wird auf Polymorphismen im ER-Rezeptor zurückgeführt (120).

#### Stimulation des ER- $\beta$

Da bei Patienten mit RA jedoch auf den SFs das Verhältnis von ER- $\alpha$  zu ER- $\beta$  in Richtung ER- $\beta$  verschoben ist, wurde auch die Beeinflussung der BAFF-Sekretion von SFs durch Stimulation mit dem ER- $\beta$ -Agonisten DPN untersucht (196). Genau wie beim ER- $\alpha$  war bei OASFs eine Steigerung der BAFF-Sekretion bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  und DPN im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit IFN- $\gamma$  festzustellen. Anders als für den ER- $\alpha$  Agonisten PPT fanden sich für DPN keine Hinweise zu Mechanismen der Steigerung der BAFF-Sekretion in der Literatur. Auffällig war auch hier, dass Inkubation mit DPN bei RASFs keinen Einfluss auf die BAFF-Sekretion hatte. In klinischen Studien hatte die Behandlung von RA-Patienten mit Agonisten des ER- $\beta$  genau wie bei Agonisten für ER- $\alpha$  keinen Effekt gezeigt (198, 199). Vermutlich ist der fehlende Effekt von ER- $\beta$  Agonisten auf die BAFF-Sekretion von RASFs ebenso in Polymorphismen des Rezeptors begründet (200, 201).

#### Stimulation des GPR30

Östrogenrezeptoragonisten können ihre Wirkung nicht nur über die ER-Subtypen  $\alpha$  und  $\beta$ , sondern auch über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR30 entfalten (202). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass der GPR30-Agonist G1 und der Antagonist G15 bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  die BAFF-Sekretion von SFs nicht beeinflussen können. Die fehlende Bedeutung von GPR30 in der Signaltransduktion von Östrogenen bei der RA war schon im Tiermodell gezeigt

worden (203). In der Literatur finden sich keine Hinweise dazu, ob dies daran liegt, dass SFs keine entsprechenden Rezeptoren exprimieren oder ob die Signaltransduktion nach Rezeptoraktivierung nicht zur Aktivierung der BAFF-Sekretion führt.

#### Stimulation mit E2

Je nach umgebenden Milieu übt E2 pro- oder antiinflammatorische Effekte aus (120). So kann es z. B. gewebeprotectiv wirken durch Hochregulation von z. B. Osteoprotegerin oder Minderung der Vorstufen von MMP-1 und MMP-3 (120, 204, 205). Bei RASFs erhöht E2 die IL-6-Produktion in Anwesenheit von IL-1 (120, 206). Bei Patienten mit Multipler Sklerose steigert Östrogenstimulation die BAFF-Produktion und verschlimmert die Erkrankung u. a. über diesen Mechanismus (207). Die divergente Rolle von E2 je nach Umgebungsmilieu war auch in der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Bei RASFs war nach 72h Inkubation bei alleiniger Zugabe von E2 ein Trend zur Minderung von BAFF festzustellen. Gleiches galt auch, wenn E2 fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  zugegeben wurde und somit zunächst alleine seine Wirkung entfalten konnte. Dies deckt sich mit den vorausgegangenen Versuchen, wo gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des ER- $\alpha$  bzw. ER- $\beta$  bei SFs die BAFF-Sekretion beeinflussen kann. Da die Signaltransduktion über ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  durch Veränderung der Gentransduktion wirkt, werden Effekte erst mit gewisser zeitlicher Latenz spürbar (115–119). E2 muss demnach zunächst eine gewisse Zeit vor Zugabe von IFN- $\gamma$  wirken, bevor es die IFN- $\gamma$  induzierte BAFF-Sekretion bei SFs vermindern kann.

Die Minderung der BAFF-Sekretion ist vermutlich NF- $\kappa$ B-vermittelt: E2 kann die NF- $\kappa$ B-Aktivität in humanen Zellen senken (120). Verminderte NF- $\kappa$ B-Aktivierung reduziert die BAFF-Sekretion (140, 208), demnach könnte eine Stimulation mit E2 bei SFs über diesen Mechanismus die BAFF-Sekretion senken. Dass nur RASFs auf die Stimulation reagierten, könnte daran liegen, dass im Gewebe von RA-Patienten mehr Sexualhormonrezeptoren exprimiert werden als im Gewebe gesunder Kontrollen (196). Nach 72-stündiger Stimulation bewirkte E2 bei zeitgleicher Stimulation mit IFN- $\gamma$  bei OASFs eine Steigerung der BAFF-Sekretion, was im Tiermodell ebenfalls so beobachtet worden war (193). Diese Erhöhung scheint über eine vermehrte Expression von p202 und STAT1 vermittelt zu sein und unterliegt

somit den gleichen Mechanismen wie die Steigerung der BAFF-Sekretion bei zeitgleicher Inkubation von SFs mit dem ER- $\alpha$  Agonisten PPT und IFN- $\gamma$  (193, 194). Im Tiermodell war gezeigt worden, dass die östrogenabhängige Signaltransduktion bei der RA hauptsächlich durch Aktivierung von ER- $\alpha$  vermittelt ist (203). Damit lässt sich erklären, warum SFs bei zeitgleicher Stimulation mit E2 und IFN- $\gamma$  das gleiche Reaktionsmuster zeigen wie SFs nach Stimulation mit PPT und IFN- $\gamma$ . ICI übt bei Brustkrebszellen und im uterinen Gewebe durch gesteigerten Umsatz des ER- $\alpha$  rein östrogenantagonistische Effekte ohne partiellen Agonismus aus. Im Gegensatz dazu konnte bei HepG2-Zellen eine Zunahme des ER- $\alpha$  nach Inkubation mit ICI nachgewiesen werden (209). Über die Steigerung der ER- $\alpha$ -Expression könnte auch die Zunahme von BAFF nach Stimulation von SFs mit ICI erklärt werden. Ob dieser Mechanismus tatsächlich ursächlich für die BAFF-Steigerung ist, muss weiter untersucht werden.

### Androgene

Bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen ist bekannt, dass Androgene wie Testosteron oder dessen Vorstufe DHEA antientzündlich wirken (210–213). Das Androgen/Östrogen-Verhältnis ist bei Patienten mit RA deutlich in Richtung Östrogene verschoben (114). In der Synovialflüssigkeit bei der RA werden zudem wesentlich niedrigere Konzentrationen von Androgenen gefunden als bei der OA (214). Der Zusammenhang zwischen Androgenen und dem von SFs sezernierten BAFF bei der RA ist bisher noch nicht untersucht worden. Einzig für Patienten mit Psoriasisarthritis hatte eine Studie gezeigt, dass bei männlichen Personen Testosteron negativ mit BAFF korreliert (109). Hingegen wurde gezeigt, dass Dexamethason, ein Steroidhormon ähnlich wie die Androgene, die BAFF-Produktion von SFs vermindert, was vermutlich an einer Dexamethason-induzierten Minderung der Aktivität von NF- $\kappa$ B am BAFF-Promotor liegt (140). Demnach scheint denkbar, dass durch Androgene genau wie durch das Steroidhormon Dexamethason NF- $\kappa$ B weniger am BAFF-Promotor wirken kann. Eine Minderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Androgene via NF- $\kappa$ B war bereits für RASFs gezeigt worden (122). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei RASFs das Androgen DHT nach 72-stündiger Inkubation die BAFF-Sekretion vermindert.

Zeitgleiche Inkubation von SFs mit IFN- $\gamma$  und DHT zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen eindeutigen Effekt im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass bei zeitgleicher Zugabe von DHT und IFN- $\gamma$  die oben beschriebene Minderung der Aktivität von NF- $\kappa$ B nach Stimulation mit DHT nicht mehr funktioniert. IFN- $\gamma$  führt, wie bereits beschrieben, nach Bindung an seinen Rezeptor über Aktivierung von STAT1 zur Erhöhung der BAFF-Sekretion (153, 155, 156). Die Aktivierung von STAT1 mindert die Aktivität von NF- $\kappa$ B (215). Stimulation von SFs mit IFN- $\gamma$  führt über Aktivierung von STAT1 zu erhöhter BAFF-Sekretion trotz Minderung von NF- $\kappa$ B, sodass die zusätzliche Minderung der Aktivität von NF- $\kappa$ B durch zugegebene Androgene die BAFF-Sekretion der SFs nicht mehr beeinflussen kann. Die Zugabe des Antiandrogens Nilutamide erhöhte die BAFF-Sekretion signifikant, da vermutlich in den Überständen vorhandene Restandrogene antagonisiert werden. Dies muss jedoch weiter untersucht werden. Die Zugabe von DHT konnte BAFF erwartungsgemäß wieder senken. Bei diesem Versuchsteil reagierten nur OASFs auf die Stimulationen. Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass RASFs weniger Androgenrezeptoren exprimieren als SFs gesunder Kontrollen (196).

Bei Zugabe von DHT fünf Stunden vor IFN- $\gamma$  war eine Minderung der BAFF-Sekretion von SFs im Vergleich zur nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kontrolle feststellbar. DHT kann in den fünf Stunden vor Zugabe von IFN- $\gamma$  offensichtlich die BAFF-Sekretion so weit mindern, dass die durch IFN- $\gamma$  induzierte BAFF-Sekretion nicht mehr in vollem Maß zum Tragen kommt. Bei Zugabe von IFN- $\gamma$  fünf Stunden vor DHT war erwartungsgemäß kein Einfluss von DHT auf die BAFF-Sekretion festzustellen, da wie oben beschrieben wahrscheinlich die Aktivität von NF- $\kappa$ B am BAFF-Promotor bereits durch IFN- $\gamma$  gehemmt wird, sodass DHT keinen Einfluss auf BAFF entwickeln kann.

### IL-6

Damit von SFs sezerniertes BAFF auf Plasmazellen antiapoptotisch wirken und deren Sekretion von Autoantikörpern fördern kann, benötigt es als Kofaktor das Zytokin IL-6, das über Aktivierung von STAT3 Signale transduziert (216, 217). Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit Inkubation mit IFN- $\gamma$  bei SFs die IL-6-Sekretion steigert. Genau wie bei der Sekretion von BAFF war eine dosisabhängige

Steigerung der IL-6-Sekretion nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  festzustellen. Damit induziert die Stimulation mit IFN- $\gamma$  bei SFs nicht nur die Sekretion von BAFF, sondern auch von dem für die Wirkung von BAFF benötigten Kofaktor IL-6. Die Steigerung von BAFF und IL-6 nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  war bereits für Speicheldrüsenepithelzellen bei Patienten mit Sjögren-Syndrom beobachtet worden: In dieser Studie wurde gezeigt, dass die erhöhte IL-6-Sekretion zum größten Teil durch BAFF induziert wird und nicht direkt durch IFN- $\gamma$ . Exogen zugeführtes IL-6 konnte die BAFF-Produktion dort jedoch nicht beeinflussen (218). Dieser Effekt scheint zelltypabhängig zu sein, da für andere Zelltypen eine Minderung der BAFF-Produktion durch IL-6 über die bereits beschriebene Aktivierung von SOCS3 gezeigt worden war (166, 167, 219). Inwieweit bei SFs die IL-6-Sekretion nicht nur als Kofaktor, sondern auch als inhibitorischer Feedback für die BAFF-Sekretion und BAFF-Wirkung dient, muss weiter untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Rolle der B-Zellen bei autoimmunen Erkrankungen wie der RA und die Möglichkeiten, den B-Zell-Pool zu beeinflussen, sind in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt, vor allem seit der therapeutische Erfolg der B-Zell-Depletion durch Biologika wie Rituximab gezeigt worden war (145). Insbesondere die Faktoren, die die Selektion und das Überleben autoreaktiver B-Zellen fördern, sind Gegenstand aktueller Forschung. Ein wesentlicher Mediator ist hierbei das in dieser Arbeit näher untersuchte Zytokin BAFF, welches für das Priming von B-Zellen in Richtung Autoimmunität verantwortlich gemacht wird (101, 108, 146, 147).

Die Regulation von BAFF durch diverse Zytokine und Hormone war Gegenstand dieser Arbeit. Dabei konnte gezeigt werden, dass die BAFF-Sekretion von SFs komplexen Regulationsmechanismen unterliegt. Bisher als antiinflammatorisch wirksam beschriebene Zytokine wie z. B. IL-10 können im entzündlichen Milieu die BAFF-Sekretion steigern (OASFs) oder unverändert hoch belassen (RASFs) und so möglicherweise zur Verschlimmerung autoimmuner Erkrankungen beitragen. Dies erklärt die Befunde vorausgegangener Studien, wonach z. B. IL-10-Gabe bei autoimmunen Erkrankungen die Krankheitsaktivität nicht verbessert und z. T. sogar noch verschlechtert (174). Gleiches galt für Hormone. In der Hoffnung auf antiinflammatorische Effekte applizierte Sexualhormone wie z. B. Agonisten am ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  bewirkten keine Verbesserung der klinischen Symptomatik (198, 199). Im Gegenteil konnte die vorliegende Studie zeigen, dass BAFF bei der Administration von Östrogenrezeptoragonisten im entzündlichen Milieu ansteigt (OASFs) oder unverändert hoch bleibt (RASFs), was das fehlende Ansprechen auf die ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ -Agonisten teilweise erklären könnte. Beobachtete antiinflammatorische Effekte von Androgenen korrelieren ebenfalls mit der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Abnahme der BAFF-Sekretion von SFs nach Stimulation mit DHT (210).

Es konnte somit gezeigt werden, dass die BAFF-Sekretion der SFs mit den klinischen Befunden nach medikamentöser Gabe diverser Hormone oder Zytokine korreliert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten in Zusammenschau mit den klinischen Befunden verschiedener Studien stark darauf hin, dass durch Fibroblasten produziertes BAFF eine zentrale Rolle in der Modulation der Krankheitsaktivität der



RA spielt. Ein wichtiges Verständnis der Regulation von BAFF ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben einige der komplexen Regulationsmechanismen der BAFF-Sekretion durch Entzündungsmediatoren und neuroendokrine Faktoren genauer dargestellt und liefern so Erkenntnisse für gezieltes medikamentöses Eingreifen in den Prozess der BAFF-getriggerten B-Zell-Aktivierung.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Harrison, Tinsley Randolph , Longo DL, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 18. Aufl., Ausg. in 4 Bd. inkl. Reg.-Bd., dt. Ausg. / hrsg. von M. Dietel ... London, Berlin: McGraw-Hill; ABW Wiss.-Verl.
2. Puttevils D, Vusser P de, Geusens P, Dens J. Increased cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: an overview. *Acta Cardiol* 2014; 69(2):111–8.
3. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423(6937):356–61.
4. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 2013; 80(1):29–33.
5. Huscher D, Merkesdal S, Thiele K, Zeidler H, Schneider M, Zink A. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany. *Ann. Rheum. Dis.* 2006; 65(9):1175–83.
6. Huscher D, Mittendorf T, Hinüber U von, Kötter I, Hoese G, Pfäfflin A et al. Evolution of cost structures in rheumatoid arthritis over the past decade. *Ann. Rheum. Dis.* 2014.
7. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* 2014; 73(7):1316–22.
8. van der Heijde, D M. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34 Suppl 2:74–8.
9. Hochberg MC, Johnston SS, John AK. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr Med Res Opin* 2008; 24(2):469–80.
10. Turesson C, Jacobsson, L T H. Epidemiology of extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2004; 33(2):65–72.
11. Kaye BR, Kaye RL, Bobrove A. Rheumatoid nodules. Review of the spectrum of associated conditions and proposal of a new classification, with a report of four seronegative cases. *Am J Med* 1984; 76(2):279–92.

12. Ziegler S, Huscher D, Karberg K, Krause A, Wassenberg S, Zink A. Trends in treatment and outcomes of rheumatoid arthritis in Germany 1997-2007: results from the National Database of the German Collaborative Arthritis Centres. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(10):1803–8.
13. Cock D de, Meyfroidt S, Joly J, Van der Elst, K, Westhovens R, Verschueren P. A detailed analysis of treatment delay from the onset of symptoms in early rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2014; 43(1):1–8.
14. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):315–24.
15. Banal F, Dougados M, Combescurre C, Gossec L. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. *Ann Rheum Dis* 2009; 68(7):1184–91.
16. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham, Clifton O 3rd et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(9):1580–8.
17. Biliavska I, Stamm TA, Martinez-Avila J, Huizinga, Thomas W J, Landewe, Robert B M, Steiner G et al. Application of the 2010 ACR/EULAR classification criteria in patients with very early inflammatory arthritis: analysis of sensitivity, specificity and predictive values in the SAVE study cohort. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(8):1335–41.
18. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365(23):2205–19.
19. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):30–7.
20. Deighton CM, Walker DJ, Griffiths ID, Roberts DF. The contribution of HLA to rheumatoid arthritis. *Clin Genet* 1989; 36(3):178–82.

21. Snir O, Gomez-Cabrero D, Montes A, Perez-Pampin E, Gomez-Reino JJ, Seddighzadeh M et al. Non-HLA genes PTPN22, CDK6 and PADI4 are associated with specific autoantibodies in HLA-defined subgroups of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2014; 16(5):414.
22. de Almeida, Denise E, Ling S, Holoshitz J. New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope. *FEBS Lett* 2011; 585(23):3619–26.
23. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205–13.
24. Okada Y, Di Wu, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 2014; 506(7488):376–81.
25. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(3):141–53.
26. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(9):835–41.
27. Bang S, Lee K, Cho S, Lee H, Lee KW, Bae S. Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status. *Arthritis Rheum* 2010; 62(2):369–77.
28. de Hair, Maria J H, Landewe, Robert B M, van de Sande, Marleen G H, van Schaardenburg D, van Baarsen, Lisa G M, Gerlag DM et al. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(10):1654–8.
29. Mikuls TR, Payne JB, Yu F, Thiele GM, Reynolds RJ, Cannon GW et al. Periodontitis and *Porphyromonas gingivalis* in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66(5):1090–100.
30. Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S. The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Curr Rheumatol Rep* 2013; 15(3):314.

31. Cutolo M, Straub RH. Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13(5-6):277–82.
32. Arend WP. The innate immune system in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(10):2224–34.
33. Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis and rheumatism* 2005; 52(9):2656–65.
34. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(6):224.
35. Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 2010; 9(8):531–5.
36. Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007; 217:19–37.
37. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383(6603):787–93.
38. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17(3):138–46.
39. Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong D et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2014.
40. Esensten JH, Wofsy D, Bluestone JA. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009; 5(10):560–5.
41. Carneiro H, da Silva, Jose Antonio Pereira, Souto-Carneiro MM. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2013; 12(3):401–9.
42. Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M. The central role of T cells in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25(5 Suppl 46):S4-11.
43. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(3):617–27.

44. Dolhain RJ, van der Heiden, A N, ter Haar, N T, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39(12):1961–9.
45. Benedetti G, Miossec P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2014; 44(2):339–47.
46. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004; 200(3):277–85.
47. Haque M, Fino K, Lei F, Xiong X, Song J. Utilizing regulatory T cells against rheumatoid arthritis. *Front Oncol* 2014; 4:209.
48. FRANKLIN EC, HOLMAN HR, MULLER-EBERHARD HJ, KUNKEL HG. An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1957; 105(5):425–38.
49. EDELMAN GM, KUNKEL HG, FRANKLIN EC. Interaction of the rheumatoid factor with antigen-antibody complexes and aggregated gamma globulin. *J Exp Med* 1958; 108(1):105–20.
50. Hayashi N, Kumagai S. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid arthritis. *Rinsho Byori* 2010; 58(5):466–79.
51. Fabien N, Goetz J, Sordet C, Humbel R, Sibilia J. New autoanti-bodies in rheumatoid arthritis: anti-citrullinated protein or peptide autoanti-bodies and the others. *Presse Med* 2008; 37(12):1756–66.
52. Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, editors. *Kelley's textbook of rheumatology*. Philadelphia: Saunders.
53. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54(1):38–46.
54. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40(2):205–11.

55. Finnegan A, Ashaye S, Hamel KM. B effector cells in rheumatoid arthritis and experimental arthritis. *Autoimmunity* 2012; 45(5):353–63.
56. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003; 301(5638):1374–7.
57. Monach PA, Hueber W, Kessler B, Tomooka BH, BenBarak M, Simmons BP et al. A broad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(37):15867–72.
58. Linsley PS, Nadler SG. The clinical utility of inhibiting CD28-mediated costimulation. *Immunol Rev* 2009; 229(1):307–21.
59. van Luu P, Vazquez MI, Zlotnik A. B cells participate in tolerance and autoimmunity through cytokine production. *Autoimmunity* 2014; 47(1):1–12.
60. Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunol Today* 1997; 18(7):343–50.
61. Ries S, Hilgenberg E, Lampropoulou V, Shen P, van Dang D, Wilantri S et al. B-type suppression: a role played by "regulatory B cells" or "regulatory plasma cells"? *Eur J Immunol* 2014; 44(5):1251–7.
62. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(1):24–33.
63. Wang Q, Ma Y, Liu D, Zhang L, Wei W. The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Int Arch Allergy Immunol* 2011; 155(3):205–11.
64. Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 2003; 162(4):1221–7.
65. Nakano K, Whitaker JW, Boyle DL, Wang W, Firestein GS. DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(1):110–7.

66. Aupperle K, Bennett B, Han Z, Boyle D, Manning A, Firestein G. NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Immunol* 2001; 166(4):2705–11.
67. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(4):a000034.
68. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298(5600):1911–2.
69. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998; 152(4):943–51.
70. Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res* 2009; 24(7):1142–6.
71. McGonagle D, Tan AL, Moller Dohn U, Ostergaard M, Benjamin M. Microanatomic studies to define predictive factors for the topography of periarticular erosion formation in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2009; 60(4):1042–51.
72. Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, Hanslik-Schnabel B, Wanivenhaus A, Chott A et al. Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005; 175(4):2579–88.
73. Milman N, Karsh J, Booth RA. Correlation of a multi-cytokine panel with clinical disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2010; 43(16-17):1309–14.
74. Straub RH, Muller-Ladner U, Lichtinger T, Scholmerich J, Menninger H, Lang B. Decrease of interleukin 6 during the first 12 months is a prognostic marker for clinical outcome during 36 months treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Br J Rheumatol* 1997; 36(12):1298–303.
75. Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int* 2014; 2014:698313.
76. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine* 2014; 70(1):11–20.



77. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 2012; 8(9):1237–47.
78. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:485–517.
79. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 2010; 40(7):1830–5.
80. Nakahara H, Song J, Sugimoto M, Hagihara K, Kishimoto T, Yoshizaki K et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(6):1521–9.
81. Lally F, Smith E, Filer A, Stone MA, Shaw JS, Nash GB et al. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 2005; 52(11):3460–9.
82. Benedetti F de, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum* 2006; 54(11):3551–63.
83. Abdel Meguid, Mona Helmy, Hamad YH, Swilam RS, Barakat MS. Relation of interleukin-6 in rheumatoid arthritis patients to systemic bone loss and structural bone damage. *Rheumatol Int* 2013; 33(3):697–703.
84. Suzuki M, Hashizume M, Yoshida H, Shiina M, Mihara M. IL-6 and IL-1 synergistically enhanced the production of MMPs from synovial cells by up-regulating IL-6 production and IL-1 receptor I expression. *Cytokine* 2010; 51(2):178–83.
85. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113(9):1271–6.
86. Bode JG, Albrecht U, Haussinger D, Heinrich PC, Schaper F. Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-kappaB-dependent signaling. *Eur J Cell Biol* 2012; 91(6-7):496–505.
87. Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332(20):1351–62.

88. Moore KW, de Waal Malefyt, R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683–765.
89. Kim J, Lee HJ, Yoo IS, Kang SW, Lee JH. Regulatory B cells are inversely associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Yonsei Med J* 2014; 55(5):1354–8.
90. Irmiler I, Brauer R. Paradoxical role of interferon-gamma in arthritis. *Z Rheumatol* 2007; 66(7):591-2, 594.
91. Chen J, Liu X. The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. *Cell. Immunol.* 2009; 254(2):85–90.
92. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:749–95.
93. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:563–91.
94. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75(2):163–89.
95. Brinckerhoff CE, Guyre PM. Increased proliferation of human synovial fibroblasts treated with recombinant immune interferon. *J Immunol* 1985; 134(5):3142–6.
96. Tran CN, Davis MJ, Tesmer LA, Endres JL, Motyl CD, Smuda C et al. Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2007; 56(5):1497–506.
97. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol* 2005; 174(2):864–70.
98. Page CE, Smale S, Carty SM, Amos N, Lauder SN, Goodfellow RM et al. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(2):R49.

99. Hou Y, Lin H, Zhu L, Liu Z, Hu F, Shi J et al. The inhibitory effect of IFN-gamma on protease HTRA1 expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2014; 193(1):130–8.
100. Kelchtermans H, Klerck B de, Mitera T, van Balen M, Bullens D, Billiau A et al. Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(2):R402-15.
101. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9(7):491–502.
102. Day ES, Cachero TG, Qian F, Sun Y, Wen D, Pelletier M et al. Selectivity of BAFF/BLyS and APRIL for binding to the TNF family receptors BAFFR/BR3 and BCMA. *Biochemistry* 2005; 44(6):1919–31.
103. Mackay F, Schneider P. TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19(3-4):263–76.
104. Meyer-Bahlburg A, Andrews SF, Yu, Karl O A, Porcelli SA, Rawlings DJ. Characterization of a late transitional B cell population highly sensitive to BAFF-mediated homeostatic proliferation. *J Exp Med* 2008; 205(1):155–68.
105. Nakajima K, Itoh K, Nagatani K, Okawa-Takatsuji M, Fujii T, Kuroki H et al. Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2007; 36(5):365–72.
106. Nagatani K, Itoh K, Nakajima K, Kuroki H, Katsuragawa Y, Mochizuki M et al. Rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes express BCMA and are stimulated by APRIL. *Arthritis Rheum* 2007; 56(11):3554–63.
107. Alsaleh G, Francois A, Knapp A, Schickel J, Sibilia J, Pasquali J et al. Synovial fibroblasts promote immunoglobulin class switching by a mechanism involving BAFF. *Eur J Immunol* 2011; 41(7):2113–22.
108. Mackay F, Siervo F, Grey ST, Gordon TP. The BAFF/APRIL system: an important player in systemic rheumatic diseases. *Curr Dir Autoimmun* 2005; 8:243–65.

109. Pongratz G, Straub RH, Scholmerich J, Fleck M, Harle P. Serum BAFF strongly correlates with PsA activity in male patients only--is there a role for sex hormones? *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28(6):813–9.
110. Karonitsch T, Aringer M. *Biologika bei SLE*. Wien Med Wochenschr 2014.
111. Goemaere S, Ackerman C, Goethals K, Keyser F de, Van der Straeten, C, Verbruggen G et al. Onset of symptoms of rheumatoid arthritis in relation to age, sex and menopausal transition. *J Rheumatol* 1990; 17(12):1620–2.
112. Ostensen M. Sex hormones and pregnancy in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 876:131-43; discussion 144.
113. Ostensen M, Villiger PM, Forger F. Interaction of pregnancy and autoimmune rheumatic disease. *Autoimmun Rev* 2012; 11(6-7):A437-46.
114. Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30(12):2597–605.
115. Green S, Walter P, Greene G, Krust A, Goffin C, Jensen E et al. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 1986; 24(1):77–83.
116. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(12):5925–30.
117. Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, Forsblad-d'Elia H, Carlsten H. Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335(1):14–29.
118. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 1997; 11(10):1486–96.
119. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 2008; 70:165–90.
120. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007; 28(5):521–74.

121. Härle P, Cutolo M, Schölmerich J, Straub RH. Rheumatoide Arthritis - pathogenetische Bedeutung der neuroendokrinen Achsen und des peripheren Nervensystems. *Medizinische Klinik* 2002 [cited 2014 Aug 24]; 97(12):720–9.
122. Xu J, Itoh Y, Hayashi H, Takii T, Miyazawa K, Onozaki K. Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1 $\alpha$  or tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biol Pharm Bull* 2011; 34(11):1724–30.
123. Keller ET, Chang C, Ershler WB. Inhibition of NF $\kappa$ B activity through maintenance of IkappaB $\alpha$  levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. *J Biol Chem* 1996; 271(42):26267–75.
124. Straub RH, Bijlsma JW, Masi A, Cutolo M. Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases—The 10-year update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2013 [cited 2014 Aug 24]; 43(3):392–404.
125. Herrmann M, Scholmerich J, Straub RH. Influence of cytokines and growth factors on distinct steroidogenic enzymes in vitro: a short tabular data collection. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966:166–86.
126. Weidler C, Struharova S, Schmidt M, Ugele B, Scholmerich J, Straub RH. Tumor necrosis factor inhibits conversion of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to DHEA in rheumatoid arthritis synovial cells: a prerequisite for local androgen deficiency. *Arthritis Rheum* 2005; 52(6):1721–9.
127. Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S. Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis Rheum* 1988; 31(10):1314–7.
128. Spector TD, Perry LA, Tubb G, Silman AJ, Huskisson EC. Low free testosterone levels in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1988; 47(1):65–8.
129. Pape H, Kurtz A, Silbernagl S, editors. *Physiologie*. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2014.

130. Gekle M, editor. Taschenlehrbuch Physiologie: 70 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2010.
131. Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M. The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol* 1999; 162(10):6278–83.
132. Pongratz G, Straub RH. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(2):117–26.
133. Lorton D, Bellinger DL, Schaller JA, Shewmaker E, Osredkar T, Lubahn C. Altered sympathetic-to-immune cell signaling via beta(2)-adrenergic receptors in adjuvant arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:764395.
134. Lappin D, Whaley K. Adrenergic receptors on monocytes modulate complement component synthesis. *Clin Exp Immunol* 1982; 47(3):606–12.
135. Heijnen CJ, Rouppe van der Voort, C, Wulffraat N, van der Net, J, Kuis W, Kavelaars A. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol* 1996; 71(1-2):223–6.
136. Baerwald CG, Laufenberg M, Specht T, Wichert P von, Burmester GR, Krause A. Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. *Br J Rheumatol* 1997; 36(12):1262–9.
137. Baerwald C, Graefe C, Muhl C, Wichert P von, Krause A. Beta 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatic diseases. *European journal of clinical investigation* 1992; 22 Suppl 1:42–6.
138. Chan, Edwin S L, Cronstein BN. Mechanisms of action of methotrexate. *Bull Hosp Jt Dis (2013)* 2013; 71 Suppl 1:S5-8.
139. Alsaleh G, Messer L, Semaan N, Boulanger N, Gottenberg J, Sibilia J et al. BAFF synthesis by rheumatoid synoviocytes is positively controlled by alpha5beta1 integrin stimulation and is negatively regulated by tumor necrosis factor alpha and Toll-like receptor ligands. *Arthritis and rheumatism* 2007; 56(10):3202–14.
140. Reyes LI, Leon F, Gonzalez P, Rozas MF, Labarca C, Segovia A et al. Dexamethasone inhibits BAFF expression in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2008; 42(2):170–8.

141. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, Boyle DL, Kalled SL, Carson DA et al. Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 2005; 174(2):864–70.
142. Systat Software GmbH. SigmaPlot Benutzerhandbuch Teil 1 [cited 2016 Sep 13].
143. Engler A, Aeschlimann A, Simmen BR, Michel BA, Gay RE, Gay S et al. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications* 2007; 359(4):884–8.
144. Kochukov MY, McNearney TA, Fu Y, Westlund KN. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291(3):C424-32.
145. Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nature reviews. Drug discovery* 2006; 5(7):564–76.
146. Cancro MP. Peripheral B-cell maturation: the intersection of selection and homeostasis. *Immunological reviews* 2004; 197:89–101.
147. Morais SA, Vilas-Boas A, Isenberg DA. B-cell survival factors in autoimmune rheumatic disorders. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 2015; 7(4):122–51.
148. Tan S, Xu D, Roschke V, Perry JW, Arkfeld DG, Ehresmann GR et al. Local production of B lymphocyte stimulator protein and APRIL in arthritic joints of patients with inflammatory arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2003; 48(4):982–92.
149. Fautrel B, Bourgeois P. Rheumatic disorders. Overview. *Drugs* 2000; 59 Spec No 1:1–9.
150. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6(11):625–35.
151. Kokebie R, Aggarwal R, Lidder S, Hakimiyan AA, Rueger DC, Block JA et al. The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis research & therapy* 2011; 13(2):R50.

152. Dolhain RJ, ter Haar, N T, Hoefakker S, Tak PP, Ley M de, Claassen E et al. Increased expression of interferon (IFN)-gamma together with IFN-gamma receptor in the rheumatoid synovial membrane compared with synovium of patients with osteoarthritis. *British journal of rheumatology* 1996; 35(1):24–32.
153. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 2004; 75(2):163–89.
154. Bluysen, Hans A R, Rastmanesh MM, Tilburgs C, Jie K, Wesseling S, Goumans M et al. IFN gamma-dependent SOCS3 expression inhibits IL-6-induced STAT3 phosphorylation and differentially affects IL-6 mediated transcriptional responses in endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 2010; 299(2):C354-62.
155. Qing Y, Stark GR. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279(40):41679–85.
156. Woo S, Im J, Jeon JH, Kang S, Lee M, Yun C et al. Induction of BAFF expression by IFN-gamma via JAK/STAT signaling pathways in human intestinal epithelial cells. *Journal of leukocyte biology* 2013; 93(3):363–8.
157. Hirth A, Skapenko A, Kinne RW, Emmrich F, Schulze-Koops H, Sack U. Cytokine mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4(2):117–25.
158. Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U et al. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture--primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res* 2001; 3(1):72–6.
159. Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefevre S, Tarner IH, Grifka J et al. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 2010; 12(3):R83.
160. Ermis A, Henn W, Remberger K, Hopf C, Hopf T, Zang KD. Proliferation enhancement by spontaneous multiplication of chromosome 7 in rheumatic synovial cells in vitro. *Hum Genet* 1995; 96(6):651–4.



161. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nature structural & molecular biology* 2004; 11(11):1060–7.
162. Lo Gullo A, Mandraffino G, Imbalzano E, Mamone F, Aragona CO, D'Ascola A et al. Toll-like receptor 3 and interleukin 1beta expression in CD34+ cells from patients with rheumatoid arthritis: association with inflammation and vascular involvement. *Clinical and experimental rheumatology* 2014; 32(6):922–9.
163. Lee S, Yoon B, Kim J, Heo Y, Woo Y, Park S et al. Interleukin-17 increases the expression of Toll-like receptor 3 via the STAT3 pathway in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Immunology* 2014; 141(3):353–61.
164. Bombardieri M, Kam N, Brentano F, Choi K, Filer A, Kyburz D et al. A BAFF/APRIL-dependent TLR3-stimulated pathway enhances the capacity of rheumatoid synovial fibroblasts to induce AID expression and Ig class-switching in B cells. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(10):1857–65.
165. Dalpke AH, Eckerle S, Frey M, Heeg K. Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling. *European journal of immunology* 2003; 33(7):1776–87.
166. Yang X, Schaper F, Teubner A, Lammert F, Heinrich PC, Matern S et al. Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo. *Journal of hepatology* 2005; 43(4):704–10.
167. Do KH, Choi HJ, Kim J, Park S, Kim K, Moon Y. SOCS3 regulates BAFF in human enterocytes under ribosomal stress. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 190(12):6501–10.
168. Kajita A, Morizane S, Takiguchi T, Yamamoto T, Yamada M, Iwatsuki K. Interferon-Gamma Enhances TLR3 Expression and Anti-Viral Activity in Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2015; 135(8):2005–11.
169. Zhao J, Kong HJ, Li H, Huang B, Yang M, Zhu C et al. IRF-8/interferon (IFN) consensus sequence-binding protein is involved in Toll-like receptor (TLR) signaling and contributes to the cross-talk between TLR and IFN-gamma signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281(15):10073–80.

170. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological reviews* 2008; 226:205–18.
171. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28(4):477–87.
172. Zhou L, Zhong R, Hao W, Wang H, Fan X, Zhang L et al. Interleukin-10 and interferon-gamma up-regulate the expression of B-cell activating factor in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Experimental and molecular pathology* 2009; 87(1):54–8.
173. Herrero C, Hu X, Li WP, Samuels S, Sharif MN, Kotenko S et al. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2003; 171(10):5034–41.
174. Saxena A, Khosraviani S, Noel S, Mohan D, Donner T, Hamad, Abdel Rahim A. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine* 2015; 74(1):27–34.
175. Neidhart M, Jungel A, Ospelt C, Michel BA, Gay RE, Gay S. Deficient expression of interleukin-10 receptor alpha chain in rheumatoid arthritis synovium: limitation of animal models of inflammation. *Arthritis and rheumatism* 2005; 52(10):3315–8.
176. Chen C, Lee ST, Wu WT, Fu W, Ho F, Lin WW. Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol* 2003; 140(6):1077–87.
177. Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 1992; 267(23):16396–402.
178. Creemers, John W M, Khatib A. Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2008; 13:4960–71.
179. Lin H, Ah Kioon M, Lalou C, Larghero J, Launay J, Khatib A et al. Protective role of systemic furin in immune response-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2012; 64(9):2878–86.

180. Turpeinen H, Raitoharju E, Oksanen A, Oksala N, Levula M, Lyytikäinen L et al. Proprotein convertases in human atherosclerotic plaques: the overexpression of *FURIN* and its substrate cytokines *BAFF* and *APRIL*. *Atherosclerosis* 2011; 219(2):799–806.
181. Bossen C, Tardivel A, Willen L, Fletcher CA, Perroud M, Beermann F et al. Mutation of the *BAFF* furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses. *Eur J Immunol* 2011; 41(3):787–97.
182. Assi LK, Wong SH, Ludwig A, Raza K, Gordon C, Salmon M et al. Tumor necrosis factor alpha activates release of B lymphocyte stimulator by neutrophils infiltrating the rheumatoid joint. *Arthritis and rheumatism* 2007; 56(6):1776–86.
183. Deo SH, Jenkins NT, Padilla J, Parrish AR, Fadel PJ. Norepinephrine increases NADPH oxidase-derived superoxide in human peripheral blood mononuclear cells via  $\alpha$ -adrenergic receptors. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 2013; 305(10):R1124–32.
184. Grailer JJ, Haggadone MD, Sarma JV, Zetoune FS, Ward PA. Induction of M2 regulatory macrophages through the  $\beta$ 2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury. *Journal of innate immunity* 2014; 6(5):607–18.
185. Stanojevic S, Dimitrijevic M, Kustrimovic N, Mitic K, Vujic V, Leposavic G. Adrenal hormone deprivation affects macrophage catecholamine metabolism and  $\beta$ 2-adrenoceptor density, but not propranolol stimulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  production. *Experimental physiology* 2013; 98(3):665–78.
186. Pongratz G, Melzer M, Straub RH. The sympathetic nervous system stimulates anti-inflammatory B cells in collagen-type II-induced arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2012; 71(3):432–9.
187. Koopman FA, Stoof SP, Straub RH, Van Maanen, Marjolein A, Vervordeldonk MJ, Tak PP. Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 2011; 17(9-10):937–48.
188. Wahle M, Kolker S, Krause A, Burmester GR, Baerwald CG. Impaired catecholaminergic signalling of B lymphocytes in patients with chronic rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(5):505–10.

189. Wahle M, Pierer M, Krause A, Kolker S, Baerwald, C G O. Decreased catecholamine-induced cell death in B lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966:425–8.
190. Straub RH, Härle P. Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation. *Rheumatic diseases clinics of North America* 2005; 31(1):43-59, viii.
191. Asaba J, Bandyopadhyay M, Kindy M, Dasgupta S. Estrogen receptor signal in regulation of B cell activation during diverse immune responses. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2015; 68:42–7.
192. Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Nieva DR, Handa RJ, Price, R H Jr, Kirschmann DA et al. Estrogen and progesterone regulation of human fibroblast-like synoviocyte function in vitro: implications in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27(7):1622–31.
193. Panchanathan R, Choubey D. Murine BAFF expression is up-regulated by estrogen and interferons: implications for sex bias in the development of autoimmunity. *Mol Immunol* 2013; 53(1-2):15–23.
194. Choubey D, Panchanathan R, Liu H. Comment on "The inhibiting Fc receptor for IgG, FcγRIIB, is a modifier of autoimmune susceptibility". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2011; 187(8):3909; author reply 3909-10.
195. Panchanathan R, Shen H, Zhang X, Ho S, Choubey D. Mutually positive regulatory feedback loop between interferons and estrogen receptor-α in mice: implications for sex bias in autoimmunity. *PloS one* 2010; 5(5):e10868.
196. Ishizuka M, Hatori M, Suzuki T, Miki Y, Darnel AD, Tazawa C et al. Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clinical science (London, England : 1979)* 2004; 106(3):293–300.
197. Manoussakis MN, Tsinti M, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. The salivary gland epithelial cells of patients with primary Sjogren's syndrome manifest significantly reduced responsiveness to 17β-estradiol. *Journal of autoimmunity* 2012; 39(1-2):64–8.
198. van Vollenhoven, Ronald F, Houbiers, Jos G A, Buttgereit F, In 't Hout, Joanna, Boers M, Leij S et al. The selective estrogen receptor α agonist Org 37663 induces estrogenic effects but lacks antirheumatic activity: a phase IIa trial

investigating efficacy and safety of Org 37663 in postmenopausal female rheumatoid arthritis patients receiving stable background methotrexate or sulfasalazine. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62(2):351–8.

199. Roman-Blas JA, Castañeda S, Cutolo M, Herrero-Beaumont G. Efficacy and safety of a selective estrogen receptor  $\beta$  agonist, ERB-041, in patients with rheumatoid arthritis: a 12-week, randomized, placebo-controlled, phase II study. *Arthritis care & research* 2010; 62(11):1588–93.

200. González-Canga A, Ugai K, Suzuki M, Okuzawa H, Negishi E, Ueno K. Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with rheumatoid arthritis symptoms. *Rheumatology international* 2010; 30(9):1259–62.

201. Sato H, Ito A, González-Canga A, Okuzawa H, Ugai K, Suzuki M et al. Association of Rsa polymorphism of the estrogen receptor- $\beta$  gene with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 2012; 32(7):2143–8.

202. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)* 2005; 307(5715):1625–30.

203. Engdahl C, Jochems C, Windahl SH, Börjesson AE, Ohlsson C, Carlsten H et al. receptor beta or G protein-coupled receptor 30. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62(2):524–33.

204. Sato T, Ito A, Mori Y, Yamashita K, Hayakawa T, Nagase H. Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts. Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta. *The Biochemical journal* 1991; 275 (Pt 3):645–50.

205. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 2001; 142(6):2205–12.

206. Kawasaki T, Ushiyama T, Inoue K, Hukuda S. Effects of estrogen on interleukin-6 production in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clinical and experimental rheumatology* 2000; 18(6):743–5.

207. Correale J, Farez MF, Ysraelit MC. Increase in multiple sclerosis activity after assisted reproduction technology. *Annals of neurology* 2012; 72(5):682–94.
208. Fu L, Lin-Lee Y, Pham LV, Tamayo A, Yoshimura L, Ford RJ. Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 2006; 107(11):4540–8.
209. Traboulsi T, El Ezzy M, Gleason JL, Mader S. Antiestrogens: structure-activity relationships and use in breast cancer treatment. *Journal of molecular endocrinology* 2017; 58(1):R15-R31.
210. Cutolo M, Serio B, Pizzorni C, Sulli A. The role of androgens in rheumatic diseases. *The Israel Medical Association journal : IMAJ* 2001; 3(10):743–8.
211. Schmidt M, Naumann H, Weidler C, Schellenberg M, Anders S, Straub RH. Inflammation and sex hormone metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1069:236–46.
212. Xu J, Itoh Y, Hayashi H, Takii T, Miyazawa K, Onozaki K. Dihydrotestosterone inhibits interleukin-1alpha or tumor necrosis factor alpha-induced proinflammatory cytokine production via androgen receptor-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB activation in rheumatoid fibroblast-like synovial cell line. *Biol Pharm Bull* 2011; 34(11):1724–30.
213. Itoh Y, Hayashi H, Xu J, Takii T, Miyazawa K, Ariga H et al. Dihydrotestosterone inhibits tumor necrosis factor alpha induced interleukin-1alpha mRNA expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(6):1140–3.
214. de la Torre, B, Hedman M, Nilsson E, Olesen O, Thorner A. Relationship between blood and joint tissue DHEAS levels in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 1993; 11(6):597–601.
215. Krämer OH, Baus D, Knauer SK, Stein S, Jäger E, Stauber RH et al. Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity. *Genes & development* 2006; 20(4):473–85.
216. Rodríguez-Bayona B, Ramos-Amaya A, López-Blanco R, Campos-Caro A, Brieva JA. STAT-3 activation by differential cytokines is critical for human in vivo-generated plasma cell survival and Ig secretion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 2013; 191(10):4996–5004.

217. Rochas C, Hillion S, Saraux A, Mageed RA, Youinou P, Jamin C et al. Transmembrane BAFF from rheumatoid synoviocytes requires interleukin-6 to induce the expression of recombination-activating gene in B lymphocytes. *Arthritis and rheumatism* 2009; 60(5):1261–71.
218. Yoshimoto K, Tanaka M, Kojima M, Setoyama Y, Kameda H, Suzuki K et al. Regulatory mechanisms for the production of BAFF and IL-6 are impaired in monocytes of patients of primary Sjögren's syndrome. *Arthritis research & therapy* 2011; 13(5):R170.
219. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* 2003; 374(Pt 1):1–20.

## **7. Danksagung**

Am Ende dieser Arbeit möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Georg Pongratz für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung bedanken.

Herzlicher Dank gilt zudem dem gesamten Team im Labor, vor allem Dr. Torsten Lowin, für die vielen geduldigen Erklärungen und die stetige Unterstützung.

Danke auch an meinen Verlobten Martin für seinen Rückhalt und seine aufmunternden Worte während meines Studiums.



## **8. Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

## **9. Lebenslauf**

### **PERSÖNLICHE ANGABEN**

**Name:** Marina Hedwig Bäuml  
**Geburtsdatum:** 15.08.1990  
**Geburtsort:** Neustadt a. d. Waldnaab

### **SCHULAUSBILDUNG**

1996 – 2000 Grundschole Püchersreuth  
2000 – 2009 Gymnasium Neustadt a. d. Waldnaab

### **AKADEMISCHE AUSBILDUNG**

2010 – 2016 Studium der Humanmedizin (Universität Regensburg)  
12/2016 Approbation als Ärztin

Freiburg, 17.07.2017

Marina Bäuml